

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt
von
Diplom-Biologin Nadja Feldmeyer
aus Bruchsal

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt
von
Diplom-Biologin Nadja Feldmeyer
aus Bruchsal

Tag der mündlichen Prüfung:

*Untersuchungen zur Regulation der Aktivierung humaner
T-Lymphozyten bei Arginindepletion*

**Gutachter: PD. Dr. Philipp Beckhove
Prof. Dr. Carsten Watzl**

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde vom 15.01.2007 – 15.01.2010 am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg in der Abteilung Zelluläre Immunologie in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Immunologie“ unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. Markus Munder angefertigt.

Während dieser Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen erstellt:

Nadja Feldmeyer, Guido Wabnitz, Stefan Leicht, Claudia Luckner, Thomas Franz, Yvonne Samstag and Markus Munder. *„Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation and actin reorganisation in activated human T Lymphocytes“*; **Posterpräsentation**, 2nd European Congress of Immunology, Berlin, 13.09. - 16.09.2010

Nadja Feldmeyer, Guido Wabnitz, Stefan Leicht, Claudia Luckner-Minden, Martin Schiller, Thomas Franz, Yvonne Samstag, Pascale Kropf, Ingrid Müller, Anthony D. Ho, and Markus Munder. *Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation and actin reorganization in activated human T lymphocytes*. Zur Publikation eingereicht.

I. Zusammenfassung

Die Verstoffwechslung der semiessentiellen Aminosäure Arginin ist entscheidend beteiligt an der Regulation der Immunantwort im Verlauf von Infektionen, entzündlichen Erkrankungen und bei Tumorwachstum. Arginin wird durch die Enzyme Arginase und Stickstoffmonoxid-Synthase abgebaut, wodurch die Verfügbarkeit der Aminosäure reguliert wird. Eine lokale Arginindepletion, welche z.B. durch Freisetzung von Arginase 1 aus myeloischen Zellen verursacht wird, führt zur völligen Hemmung der Proliferation und zahlreicher Effektor-Funktionen aktivierter humaner T-Lymphozyten. Hierbei waren die intrazellulären Mechanismen, welche zur Suppression zahlreicher T-Zell-Funktionen bei Argininmangel führen, bei Beginn dieser Promotionsarbeit, weitgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Argininmangel auf die intrazelluläre Signaltransduktion in aktivierten primären humanen T-Zellen gesunder Blutspender *in vitro* untersucht. Durch proteomische Analysen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der Aminosäure Arginin bei T-Zell-Aktivierung zu einer signifikant reduzierten Dephosphorylierung des Aktin-bindenden Proteins Cofilin führt. Normalerweise führt die Stimulation über den T-Zell-Rezeptor und kostimulatorische Moleküle via Dephosphorylierung zur Aktivierung von Cofilin, welches eine entscheidende Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, der T-Zellproliferation und Zytokinsekretion spielt. Im Zusammenhang mit der Persistenz der phosphorylierten Form von Cofilin zeigte sich bei Argininabwesenheit ein veränderter F-Aktingehalt in aktivierten T-Zellen. Außerdem korrelierte die verminderte Ausbildung der Immunologischen Synapse, der Kontaktzone zwischen T-Zelle und antigenpräsentierende Zelle, mit der fehlenden Aktin-Bindefähigkeit von Cofilin. Im Gegensatz dazu ist ein weiterer Cofilin-abhängiger Prozess, die Migration, bei Argininabwesenheit unbeeinträchtigt. Ferner konnte erstmals eine dichotome Regulation der Zytokinsynthese und -sekretion in humanen T-Lymphozyten bei Arginindefizienz gezeigt werden. Während Arginindepletion zu einer signifikanten Inhibition von Produktion und Sekretion der Zytokine IFN- γ , TNF- β und IL-10 führt, zeigte sich eine unbeeinträchtigte Synthese der Zytokine IL-2, IL-6 und IL-8.

Weitere Untersuchungen zur frühen (1-30 min) Signaltransduktion bei T-Zell-Aktivierung zeigten, dass der Kalziumflux unabhängig von der extrazellulären Argininkonzentration induziert wird. Auch fanden sich keine argininabhängigen Unterschiede in der frühen Cofilin-Dephosphorylierung sowie bei Aktivierung der für die Cofilin-Dephosphorylierung verantwortlichen Ras-MEK-ERK- und Ras-PI3K-Akt-Signalwege. Im weiteren Verlauf zeigte sich dann bei Argininmangel in Assoziation mit der beeinträchtigten Cofilin-

Dephosphorylierung eine reduzierte ERK-Phosphorylierung bei prolongierter Akt-Phosphorylierung.

Diese Alterationen der T-Zell-Signaltransduktion fanden sich gleichartig auch bei Stimulation der Zellen in einem durch humane Granulozyten-Arginase (aus humanem Eiter ex vivo gewonnen) von Arginin depletierten Milieu und waren durch Zugabe eines Arginase-Inhibitors vollständig inhibierbar. Dieses Modell unterstreicht die Relevanz der beschriebenen T-Zell-Alterationen für die Situation granulozytär dominierter Inflammation *in vivo*.

Das durch diese Arbeit gewonnene, bessere Verständnis intrazellulärer Regulationsmechanismen humaner T-Lymphozyten bei Arginindefizienz sollte dazu beitragen, in Zukunft in die unerwünschte Immunsuppression bei Tumorerkrankungen oder chronischer Inflammation kausal pharmakologisch eingreifen zu können.

II Abstract

Metabolism of the semi-essential amino acid arginine is fundamentally involved in regulation of the immune response during infection, inflammatory diseases and tumour growth. The availability of arginine is regulated by the enzymes arginase and nitric oxide synthase. Local arginine depletion, e.g. mediated through the release of arginase 1 by myeloid cells, results in the total suppression of proliferation and inhibition of several effector functions of activated human T-lymphocytes. The intracellular mechanisms leading to the observed suppression of T-cell functions under conditions of arginine depletion were largely uncharacterised at the start of this thesis.

In this thesis, the effect of arginine depletion on intracellular signal transduction pathways in activated T cells of healthy human blood donors was investigated. Proteomic analysis revealed that the absence of the amino acid arginine during T cell activation leads to a significant reduction in dephosphorylation of the actin-binding protein cofilin. Cofilin is an essential component in reorganisation of the actin cytoskeleton, T cell proliferation and cytokine secretion and is activated through dephosphorylation upon stimulation of the T cell receptor and co stimulatory molecules. Persistence of the phosphorylated form of cofilin in the absence of arginine results in altered F-actin concentration in activated T cells. Furthermore, a disturbed formation of the immunological synapse, the contact area between T cells and antigen presenting cells, correlates with the missing actin binding capacity of cofilin. In contrast, chemotactic migration (another cofilin-dependent process), is unaltered in the absence of arginine. In addition, dichotomic regulation of cytokine synthesis and secretion in human T cells upon arginine depletion was demonstrated for the first time. While arginine depletion leads to significant inhibition in the production and secretion of IFN- γ , TNF- β and IL-10, the synthesis of IL-2, IL-6 and IL-8 is unimpaired.

Furthermore, it was shown that the induction of calcium flux during early signal transduction (1-30 min) in activated T cells is independent of the extracellular arginine concentration. Also, cofilin-dephosphorylation itself as well as the Ras-MEK-ERK- and Ras-PI3K-Akt signal pathways, which lead to cofilin dephosphorylation, are arginine-independent within the first 30 min of T cell activation. Later on, arginine deficiency leads to reduced phosphorylation of ERK but increased phosphorylation of Akt, and this correlates with impaired dephosphorylation of cofilin. Finally, the observed alterations of

the T cell signal transduction pathways were also demonstrated upon T cell stimulation in a micromilieu that was depleted of arginine by liberated granulocyte arginase from human pus. This model emphasizes the physiological relevance of the described T cell alterations for granulocyte-dominated inflammation *in vivo*.

The results of this thesis advance the understanding of regulatory mechanisms in human T cells under conditions of arginine deficiency and will hopefully enable improved pharmacological treatment of unwanted immune suppression caused by tumours and chronic inflammation.

III Inhaltsverzeichnis

I.	ZUSAMMENFASSUNG	I
II	ABSTRACT	III
III	INHALTSVERZEICHNIS	V
1	EINLEITUNG	1
	1.1 DAS IMMUNSYSTEM	1
	1.2 DIE ADAPTIVE IMMUNANTWORT	2
	1.3 DIE T-ZELL-VERMITTELTE IMMUNANTWORT	3
	1.4 DIE IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE	5
	1.5 T-ZELL-AKTIVIERUNG	6
	1.5.1 <i>Der T-Zell-Rezeptor-Komplex und Signaltransduktion nach Antigen-Erkennung</i>	6
	1.5.2 <i>Kostimulation</i>	8
	1.6 DAS AKTIN-ZYTOSKELETT	9
	1.7 ARGINASE: EIN ENZYM DES HARNSTOFFZYKLUS UND DER IMMUNREGULATION	12
	1.8 DIE BEDEUTUNG UND FUNKTION DER ARGINASE I IM IMMUNSYSTEM	14
	1.9 DIE BEDEUTUNG DER ARGINASE BEI DER IMMUNANTWORT GEGEN TUMOREN	16
	1.10 SUPPRESSION DER IMMUNANTWORT BEI ARGININDEFIZIENZ	16
	1.11 BEKANNTE MECHANISMEN DER T-ZELL-SUPPRESSION BEI AMINOSÄUREMANGEL	19
	1.12 ZIEL DER ARBEIT	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
	2.1 MATERIAL	22
	2.1.1 <i>Zellen</i>	22
	2.1.2 <i>Antikörper – FACS</i>	22
	2.1.3 <i>Antikörper – Western Blot</i>	23
	2.1.4 <i>Sonstige Antikörper</i>	24
	2.1.5 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	24
	2.1.6 <i>Geräte und Laborausstattung</i>	28
	2.1.7 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	30
	2.1.8 <i>Software</i>	31
	2.1.9 <i>Medien</i>	31
	2.1.10 <i>Puffer und Lösungen</i>	32
	2.2 METHODEN	38
	2.2.1 <i>Zellkultur</i>	38
	2.2.1.1 <i>Isolierung primärer T-Lymphozyten</i>	38
	2.2.1.2 <i>Isolierung Peripherer Blut Mononukleärer Zellen (PBMC)</i>	38
	2.2.1.3 <i>Isolierung peripherer Blut-T-Lymphozyten</i>	39
	2.2.1.4 <i>Kultivierung und Einfrieren von Lymphom-Zelllinien</i>	40
	2.2.1.5 <i>Einfrieren von Zellpellets</i>	41
	2.2.1.6 <i>Herstellen der T-Zelllysate</i>	41
	2.2.1.7 <i>Herstellen der Proben für Western Blot Analysen</i>	41
	2.2.2 <i>T-Zellstimulation</i>	42

2.2.2.1	Standardansatz.....	42
2.2.2.2	Stimulation von T-Zellen mit anti-CD3/-CD28-gekoppelten Partikeln.....	42
2.2.2.3	Kurzzeitstimulation mit selbsthergestellten anti CD3/ anti-CD28-gekoppelten Partikeln	42
2.2.2.4	Stimulation von T-Zellen mittels Antigenpräsentierender Zellen.....	43
2.2.2.5	Stimulation von T-Zellen in Anwesenheit von humanem Eiter	44
2.2.3	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	44
2.2.4	<i>Bestimmung der Arginaseaktivität von humanem Eiter</i>	44
2.2.5	<i>Durchflußzytometrie</i>	45
2.2.5.1	Nachweis zytokinproduzierender Zellen mittels intrazellulärer FACS-Färbung	45
2.2.5.2	Nachweis von filamentösem Aktin mittels intrazellulärer FITC-Phalloidin FACS-Färbung.....	46
2.2.5.3	Bestimmung des Kalziumflux	47
2.2.6	<i>Proliferationsmessung</i>	47
2.2.6.1	Einbau von [³ H]-Thymidin in die Zellen	47
2.2.6.2	Durchflußzytometrische Messung der zellulären Proliferation mittels CFSE-Färbung.....	48
2.2.7	<i>Bestimmung der Zytokinproduktion</i>	49
2.2.7.1	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	49
2.2.8	<i>Proteinbiochemie</i>	50
2.2.8.1	Western Blot	50
2.2.8.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	51
2.2.9	<i>Färben von Gelen</i>	54
2.2.9.1	Silberfärbung	54
2.2.9.2	Fluoreszenz-Färbung mit SYPRO®Ruby	54
2.2.9.3	Colloidal Coomassie-Färbung.....	54
2.2.10	<i>Protein-Sequenzierung und Massenspektrometrie</i>	55
2.2.11	<i>Messung der immunologischen Synapse</i>	55
2.2.12	<i>Migrationsassay</i>	56
2.2.13	<i>Statistische Auswertung</i>	56
3	ERGEBNISSE	57
3.1	HEMMUNG DER T-ZELLPROLIFERATION BEI ARGININDEFIZIENZ.....	57
3.2	ETABLIERUNG DER 2D-GELELEKTROPHORESE.....	58
3.3	IDENTIFIZIERUNG VERÄNDERTER PROTEINEXPRESSIONEN IN STIMULIERTEN T-ZELLEN BEI ARGININDEFIZIENZ.....	61
3.4	VERGLEICH DER T-ZELLPROLIFERATION BEI STIMULATION MIT ANTI-CD3 / -CD28 UND SEBELADENEN RAJI B-ZELLEN	65
3.5	AUSBILDUNG DER IMMUNOLOGISCHEN SYNAPSE ZWISCHEN T-ZELLEN UND APZ	67
3.6	EINFLUß VON ARGININ AUF DEN F-AKTINGEHALT AKTIVIERTER HUMANER T-LYMPHOZYTEN ..	70
3.7	EINFLUß VON ARGININ AUF DIE CHEMOTAXIS HUMANER T-LYMPHOZYTEN.....	73
3.8	REGULATION DER ZYTOKINSYNTHESE UND -SEKRETION IN HUMANEN T-ZELLEN BEI STIMULATION IN ARGININFREIEM MEDIUM.....	75

3.9	WEITERE ZYTOKINE.....	85
3.10	UNTERSUCHUNG DER FRÜHEN SIGNALTRANSDUKTION IN HUMANEN T-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON ARGININ.....	90
3.10.1	<i>Arginin-unabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt bzw. Dephosphorylierung von Cofilin bei Kurzzeitstimulation humaner T-Zellen.....</i>	91
3.10.2	<i>Signaltransduktion über Kalzium bei Arginindefizienz</i>	94
3.11	REGULATION VON COFILIN, ERK UND AKT BEI ARGININDEPLETION DURCH PMN-ARGINASE AUS HUMANEM EITER	95
4	DISKUSSION	99
4.1	VERÄNDERUNG DES PROTEIN-EXPRESSIONSMUSTERS AKTIVierter, HUMANEN T-LYMPHOZYTEN BEI ARGININDEFIZIENZ	99
4.2	EINFLUSS VON ARGININMANGEL AUF DAS AKTIN-ZYTOSKELETT HUMANER T-ZELLEN NACH APZ-BASIERTER STIMULATION.....	102
4.2.1	<i>Beeinträchtigung der Ausbildung der IS durch Arginindefizienz</i>	102
4.2.2	<i>Keine Beeinträchtigung der Migration humaner T-Lymphozyten in Abhängigkeit von Arginin.....</i>	103
4.3	EINFLUSS VON ARGININ AUF DIE ZYTOKINSYNTHESE UND -SEKRETION HUMANER T-ZELLEN. 104	
4.3.1	<i>Unterschiedliche Regulation der Zytokinsekretion</i>	104
4.4	KEIN EINFLUSS VON ARGININ AUF FRÜHE SIGNALTRANSDUKTIONS-EREIGNISSE IN PRIMÄREN HUMANEN T-LYMPHOZYTEN	105
5	ANHANG	110
5.1	TABELLEN.....	110
6	LITERATURVERZEICHNIS	114
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	126
8	DANKSAGUNG.....	132

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist wesentlich für den Erhalt der Integrität des menschlichen Organismus und schützt diesen vor ubiquitären Pathogenen wie Bakterien, Pilzen oder Viren und maligne transformierten körpereigenen Zellen. Effektor-Zellen (wie Makrophagen, Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) unseres Immunsystems erkennen und eliminieren diese und verhindern somit Gewebeschädigungen. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die Unterscheidung zwischen „körpereigenen“ und „fremden“ Antigenen durch spezifische Oberflächenrezeptoren (wie Toll-like Rezeptoren (TLR) und T-Zell-Rezeptoren (TZR)) der Immunzellen.

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Organen (wie Thymus, Knochenmark, Milz und Lymphknoten), beweglichen Immunzellen und löslichen Serum-Bestandteilen. In der Milz, dem Thymus und dem Knochenmark findet die Bildung und Reifung der Immunzellen statt; in den Lymphknoten hingegen werden diese vor allem aktiviert. Man unterscheidet zwischen der innaten und der adaptiven Immunantwort, wobei beide immunologischen Abwehrsysteme vielfältig miteinander interagieren. Innate Immunantworten, v.a. durch Makrophagen, dendritische Zellen (DZ) und NK-Zellen erfolgen in der Regel schnell nach Verletzung der Integrität des Organismus, z.B. im Rahmen einer Infektion. Die innate Immunabwehr basiert z.T. auf unspezifischen Aktivierungsmechanismen der beteiligten Immunzellen, allerdings wurden in den letzten Jahren auch spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktionen (z.B. via TLR) charakterisiert (Takeda and Akira 2005).

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Barriere nach einer Infektion mit einem Pathogen dar. Die verantwortlichen Zellen dieses zellulären Abwehrmechanismus sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Das Pathogen wird über konservierte Strukturen erkannt, die von Rezeptoren auf den Makrophagen gebunden werden. Der Fremdkörper wird nun über Phagozytose aufgenommen und eliminiert. Makrophagen lösen zusätzlich Entzündungs-Prozesse (Inflammation) aus, die weitere phagozytierende Zellen wie neutrophile Granulozyten und Effektor-Moleküle zum Infektionsherd rekrutieren. Bei der Einleitung dieser Immunantwort spielen DZ eine entscheidende Rolle als Vermittler. Unreife DZs nehmen in der Peripherie Antigene auf, prozessieren diese und

präsentieren sie anschließend an spezielle Oberflächenmoleküle, den MHC (engl. major histocompatibility complex), gebunden. Die aktivierten DZs wandern nun als reife dendritische Zellen in die angrenzenden Lymphknoten. Im Falle einer spezifischen Erkennung des präsentierten antigenen Peptidfragmentes werden interagierende Lymphozyten aktiviert. Die aktivierten Lymphozyten wandern in das infizierte Gewebe ein, um dort die Infektion zu eliminieren (Murphy et al. 2009). Die adaptive Immunantwort benötigt etwa eine Woche, um nach klonaler Expansion der antigenspezifischen Lymphozyten die Infektion zu beseitigen. Bis zu diesem Zeitpunkt wird die Infektion durch das innate Immunsystem unter Kontrolle gehalten. Bei einer Re-Infektion kann das adaptive Immunsystem bereits nach 4 h bis 96 h reagieren, da sich bei der Erst-Infektion Gedächtniszellen gebildet haben. Bei der Immunabwehr wird des Weiteren zwischen zellulärer und humoraler Antwort unterschieden. Humorale Bestandteile des innaten Immunsystems sind vor allem Zytokine, Enzyme und das Komplementsystem, wohingegen phagozytierende Zellen und NK-Zellen die zellulären Komponenten bilden. Die adaptive humorale Immunität wird durch Antikörper, gebildet von B-Lymphozyten, vermittelt und die zelluläre Antwort durch Subpopulationen der T-Lymphozyten.

1.2 Die adaptive Immunantwort

Die besonderen Merkmale des adaptiven Immunsystems sind seine Spezifität, Diversität und die Vermittlung eines langfristigen Schutzes durch das immunologische Gedächtnis. Neben antigen-präsentierenden Zellen (APZ) stellen zwei Gruppen von Zellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunantwort dar: T- und B-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten gewährleisten hierbei die Zell-vermittelte Immunabwehr und unterstützen die B-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten selbst sind durch die Antikörper-Produktion für die humorale Immunität verantwortlich. Diese Immunzellen besitzen jeweils einen spezifischen Rezeptor mit einer hochvariablen Region, der bestimmte Oberflächenstrukturen eines Moleküls (Epitope) erkennt. Die spezifische Erkennung der Antigene erfolgt bei B-Zellen über membran-gebundene Antikörper, welche die wesentliche Komponente des B-Zell-Rezeptors (BZR) darstellen und bei T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor (TZR). Die sehr große Anzahl individuell unterschiedlicher Lymphozyten wird über somatische Rekombinationen gewährleistet, durch die jeder einzelne B- und T-Lymphozyt seinen charakteristischen Antigen-spezifischen Rezeptor erhält. Jeder Lymphozyt kann somit nur ein ganz bestimmtes Antigen erkennen (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Nach adäquater Stimulierung durch eine APZ tritt der T-Lymphozyt in den Zellzyklus ein. Diese klonale Vermehrung garantiert eine adäquate und ausreichend starke Immunantwort auf eine

bestimmte Infektion. B-Lymphozyten differenzieren zu antikörper-produzierenden Plasmazellen. Die durch die Plasmazellen gebildeten Antikörper können Strukturen wie z.B. Infektionserreger oder Tumorzellen binden und dadurch entweder direkt inhibieren oder für die Lyse durch das Komplementsystem bzw. zur Phagozytose durch Fresszellen markieren. Die Aktivierung der B-Zellen über ein Antigen reicht jedoch meist nicht aus, um eine somatische Hypermutation und den Isotyp-Klassenwechsel (z.B. von IgM zu IgG) hervorzurufen und somit eine hoch-affine humorale Immunantwort auszulösen. Hierzu werden Signale der unterstützenden CD4⁺ T-Helferzellen (T_H-Zellen), einer Untergruppe der T-Lymphozyten, benötigt. Ohne die zusätzlich stimulierenden Signale, vermittelt durch Zytokine der T-Zellen, werden die B-Lymphozyten nicht vollständig aktiviert. T-Zellen bestehen aus verschiedenen Subpopulationen mit unterschiedlichen aktivierungsabhängigen Effektorfunktionen. Ein Teil dieser T-Lymphozyten aktiviert z.B. Makrophagen und regt B-Zellen zur Antikörper-Produktion an, eine andere Subpopulation spielt bei der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien und Viren eine bedeutende Rolle (Murphy et al. 2009). Sobald eine Infektion mit Hilfe des adaptiven Immunsystems beseitigt wurde, sterben die Zellen durch einen programmierten Zelltod (Apoptose). Die apoptotischen Zellen werden durch Makrophagen aufgenommen und eliminiert. Aus einigen Effektor-Zellen entstehen jedoch schon während der adaptiven Immunantwort T- bzw. B-Gedächtnis-Zellen. Das immunologische Gedächtnis sorgt in der Regel für einen langfristigen Schutz vor einer Reinfektion mit dem gleichen Krankheitserreger. Bei einer erneuten Interaktion mit dem entsprechenden Antigen erfolgt eine viel schnellere und effektivere sekundäre Immunantwort (Murphy et al. 2009).

1.3 Die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Reife naive T-Lymphozyten patrouillieren ständig zwischen den peripheren Lymphorganen und dem Blut hin und her, bis sie ihrem spezifischen Antigen begegnen, welches sich auf der Oberfläche von APZ, in Form eines Peptid:MHC-Komplexes befindet. So wird die T-Zelle über Wechselwirkung des TZR in Assoziation mit Ko-Rezeptoren mit dem Peptid:MHC-Komplex der APZ aktiviert und differenziert zu einer T-Effektor-Zelle mit Akquisition neuer Funktionen. T-Zellen mit einem CD4-Korezeptor werden als T-Helferzellen (T_H-Zellen) oder CD4⁺ T-Zellen bezeichnet, erkennen Antigene, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden und vermitteln die Aktivierung von anderen Leukozyten. T-Zellen, welche den Korezeptor CD8 exprimieren werden als CD8⁺ T-Zellen oder zytotoxische T-Zellen bezeichnet, erkennen antigene Peptide im Kontext von MHC-Klasse-I-Komplexen und fungieren selbst als Effektor-Zellen, indem sie z. B. virusinfizierte

Zellen abtöten. MHC-I wird auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentiert v.a. Peptide aus intrazytoplasmatischen Proteinen.

Nach Aktivierung einer naiven T_H-Zelle kommt es nicht nur zu einer klonalen Proliferation, sondern, je nach Zytokinmilieu im Rahmen der Aktivierung, zu einer Differenzierung in bestimmte T_H-Effektorzell-Phänotypen. Im murinen System wurde z.B. eine dichotome Differenzierung in sogenannte T Helfer 1 (T_H1) bzw. T Helfer 2 (T_H2) T-Zellen gut charakterisiert. T_H1-Zellen produzieren vor allem Interferon- γ und IL-2, aktivieren infizierte Makrophagen und unterstützen B-Zellen bei ihrer Antikörper-Produktion, wohingegen T_H2-Zellen die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren und B-Zellen speziell beim Antikörper-Isotypenwechsel zu IgE unterstützen. Eine weitere Untergruppe der T_H-Zellen sind die T_H17-Zellen, die IL-17 produzieren und z.B. wesentlich an autoimmuner Inflammation beteiligt sind. Weiterhin sind verschiedene Subpopulationen regulatorischer T-Zellen (T_H3, T_R1, T_{reg}-Zellen) charakterisiert worden, welche über supprimierende Zytokine (z.B. IL-10 und TGF- β) oder zelluläre Interaktionen die sich entwickelnde oder bereits etablierte T-Zell-Antwort supprimieren können. Sie sind wichtig für die Begrenzung von Immunantworten und die Inhibition von Autoimmunreaktionen. Insgesamt gilt allerdings für alle diese unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen, dass ihre Charakterisierung im Mausmodell wesentlich klarer ist als beim Menschen.

Um mit den seltenen spezifischen APZ in Kontakt zu kommen, müssen die Lymphozyten vom Blut in die lymphatischen Organe gelangen. Nach Aktivierung müssen die T-Zellen wieder aus dem lymphatischen Gewebe durch das vaskuläre Endothel transmigrieren und in das inflammatorische Gewebe einwandern. Dies geschieht über mehrere Schritte: Durch die niedrig affine Bindung von Selektinen auf der Oberfläche der Lymphozyten an das Gefäß-Endothel verlangsamen sich die Zellen und rollen somit an der Gefäßwand entlang. Die darauffolgende lokale Produktion von Zytokinen wie TNF- α durch die T-Lymphozyten führt einerseits durch positive Rückkopplung zu einer vermehrten Zytokin-Produktion und andererseits zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 auf den Endothelzellen. Des Weiteren produzieren und sezernieren die Zellen des Endothels spezifische Chemokine (z.B. SDF-1, IL-8), deren Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche zu einer Aktivierung von Integrinen wie LFA-1 führt. LFA-1 auf T-Zellen tritt mit ICAM-1 auf dem Gefäß-Endothel in Wechselwirkung, wodurch eine hoch-affine Bindung zwischen den Zellen entsteht. In der Folge können die T-Zellen durch Zellzwischenräume des Endothels migrieren und gelangen in das Gewebe (Diapedese) (Murphy et al. 2009, Wittchen 2009). Während dieses Prozesses ist es für die Zelle essentiell, die dafür benötigten Proteine (z. B.

Adhäsions-Moleküle, Chemokin-Rezeptoren) an die Kontaktstelle zur Gefäßwand zu rekrutieren und ihre Morphologie zu verändern. Dies wird durch ein flexibles Zytoskelett in der Zelle gewährleistet, das sich bei der Transmigration so umverteilt, dass ein vorderer und ein hinterer Teil entstehen. Der vordere Teil (Zellfront oder engl. „leading edge“) ist mit Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen angereichert und der Hauptanteil des Aktin-Zytoskeletts ist dort lokalisiert, wo die Zelle sich nach vorne bewegt. Der hintere Teil (Uropod) der Zelle, in dem sich Zytoskelett-Elemente und Membran-Ankerproteine der Ezrin-Radixin-Moesin-Proteinfamilie befinden, wandert nach. Im Gewebe bewegen sich die T-Zellen amöboid vorwärts, d.h. sie bilden aktin-reiche Ausstülpungen, Pseudopodien, an der Zellfront, nicht aber am Uropod. Der hintere Teil der Zellen wird durch Kontraktionskräfte nachgezogen. Während der Interaktion mit der „richtigen“ APZ, zieht der Lymphozyt den Uropod ein und bildet Pseudopodien aus, um einen engen Kontakt herzustellen. Diese Verbindung resultiert in der Ausbildung einer aktin-reichen Kontaktzone in der sich hoch-organisierte Proteincluster (z.B. TZR-Cluster) bilden, die für die Aktivierung und Funktion der T-Zellen essentiell sind (Burkhardt et al. 2008).

1.4 Die Immunologische Synapse

Während der Aktivierung von T-Zellen kommt es in der Kontaktzone zwischen Lymphozyt und APZ zur Ausbildung einer komplexen Struktur. Analog zu neuronalen Synapsen wurde diese Struktur als reife Immunologische Synapse (IS) bezeichnet. Sie ist in zwei Bereiche unterteilt: eine Zentralregion, die den inneren Aktivierungsbereich cSMAC (engl. central supramolecular activation cluster) bildet, in dem sich T-Zell-Rezeptoren sowie assoziierte Ko-Rezeptoren wie CD2 und Signal-Moleküle anreichern und einen peripheren Adhäsionsring pSMAC (engl. peripheral SMAC), in dem LFA-1 und der Membran-Anker Talin lokalisiert sind (Burkhardt et al. 2008, Smith-Garvin et al. 2009). Die Ausbildung einer IS geht gleichzeitig einher mit einer drastischen morphologischen Veränderung und der Polarisation der Zelle zur Kontaktzone hin. Durch diese Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts entsteht eine stabile und enge Verbindung. Dies führt auch zu einer Umstrukturierung des Mikrotubuli-Organisationszentrums (MTOC, engl. microtubule-organizing center), von dem sich das Gerüst der Mikrotubuli und des Golgi-Apparats bildet, durch das die meisten Proteine wandern, die freigesetzt werden sollen. Nur so kann eine gezielte Übertragung von Signal-Molekülen erfolgen. Bei der Interaktion einer zytotoxischen T-Zelle mit ihrer Zielzelle können somit z.B. die zytotoxischen Granula

gezielt an der Kontaktstelle freigesetzt werden. Die IS kann einige Sekunden bis hin zu mehreren Stunden bestehen. Kurze Verbindungen sind von Vorteil, da dies den T-Zellen erlaubt, in ihrem Umfeld nach der der jeweiligen relevanten Peptidantigen-präsentierenden Zelle zu suchen. Eine länger andauernde IS ist wichtig für die Reifung und Poliferation von naiven T-Zellen und für das Töten von Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass nicht nur eine Art der IS existiert, sondern die unterschiedlichen Strukturen qualitativ und quantitativ variieren (Kummerow et al. 2009).

1.5 T-Zell-Aktivierung

1.5.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex und Signaltransduktion nach Antigen-Erkennung

Der T-Zell-Rezeptor ist ein Heterodimer und besteht aus zwei Transmembranglykoproteinketten, die man als α - und β -Kette bezeichnet (einige wenige T-Zellen exprimieren strukturähnliche γ - und δ -Polypeptidketten). Jede dieser Ketten besitzt einen variablen und einen konstanten Anteil, wobei die variablen Domänen zusammen die Bindungsstelle für ein spezifisches Antigen bilden. Der variable, extrazelluläre Anteil ist bei jeder Zelle individuell und für die hohe Spezifität der Zellen verantwortlich. Durch den TZR alleine kann jedoch kein Signal in die Zelle weitergeleitet werden, da dessen zyttoplasmatische Enden zu kurz sind. Für die Signalweiterleitung ist der CD3-Komplex zuständig, der aus den Proteinketten CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ besteht sowie der homodimeren ζ -Kette. Der funktionsfähige TZR ist mit dem CD3-Komplex und den ζ -Ketten assoziiert und wird als T-Zell-Rezeptor-Komplex bezeichnet. Alle CD3-Proteinketten und die ζ -Kette enthalten ein ähnliches Signal-Motif, das sogenannte ITAM (engl. immunoreceptor tyrosin-based activation motif). Wird der TZR über antigen-spezifische Bindung mit seinem Ko-Rezeptor CD4 oder CD8 assoziiert, werden die ITAM-Sequenzen an ihren Tyrosinresten durch zwei Proteintyrosinkinasen der Src-Familie, Lck (Korezeptor-assoziiert) und Fyn (TZR-assoziiert) phosphoryliert (Borst et al. 1984, Reth 1989, Smith-Garvin et al. 2009, Murphy et al 2009). An die phosphorylierten ITAMs der ζ -Polypeptid-Ketten bindet eine weitere Tyrosinkinase, ZAP-70 (ζ -Assoziiertes Protein von 70 kDa), die für die folgende Signalübertragung verantwortlich ist (Weiss and Littman 1994). Daraufhin wird ZAP-70 von Lck phosphoryliert und aktiviert. Diesem Schritt folgt die Phosphorylierung der Adapterproteine LAT (eng. linker for activation of T cells) und SLP-

76 (engl. SH2 domain containing lymphocyte protein of 76 kDa). Die Adapterproteine besitzen selbst keine enzymatische Funktion, können aber mit ihren SH2-Bindedomänen zusätzliche Signalmoleküle an die Plasmamembran rekrutieren und somit weitere Ereignisse stromabwärts initiieren. Hierzu gehören u.a. Aktin-Polymerisation, Induktion von Calcium-Flux, Aktivierung von Ras und eine veränderte Transkription (Finco et al. 1998, Samelson 2002). Das Enzym Phospholipase C- γ (PLC- γ) ist eines dieser Signalmoleküle. Sie spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂), einen Bestandteil der inneren Schicht der Plasmamembran und erzeugt dabei zwei wichtige Signalmoleküle, Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Die Aktivierung der PLC- γ führt über mehrere Signalwege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und letztendlich zur Produktion von Zytokinen (s. Abb.1.5.1) (Germain 2001, Murphy et al. 2009, Smith-Garvin et al. 2009).

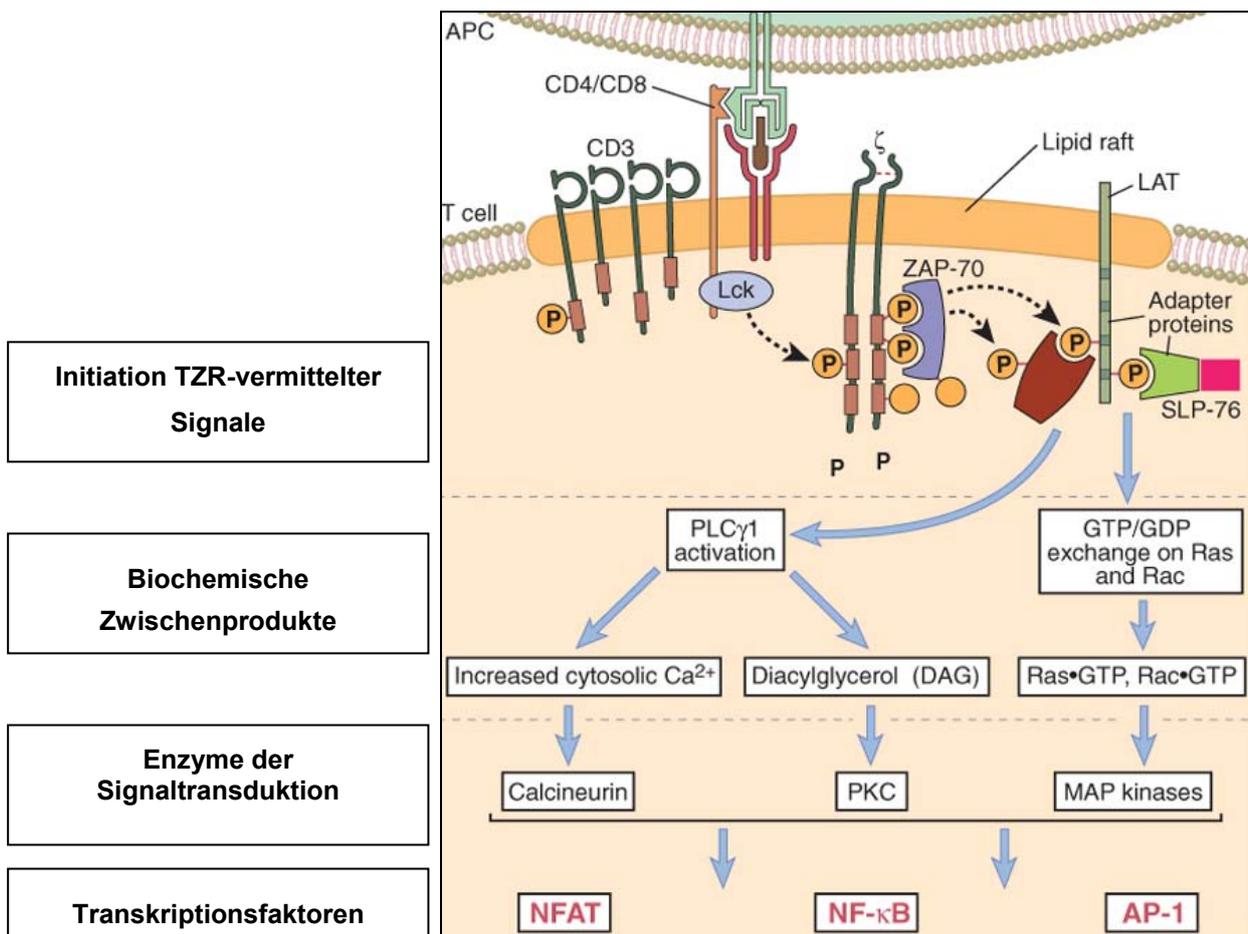


Abb.1.5.1: Intrazelluläre Signaltransduktion während der T-Zell-Aktivierung. Die Bindung von TZR und Ko-Rezeptoren an die MHC-Komplexe auf der APZ initiiert die proximale Signaltransduktion, die zur Phosphorylierung der ζ -Kette, Bindung und Aktivierung von ZAP-70, Phosphorylierung von Adapterproteinen und Aktivierung zahlreicher zellulärer Enzyme führt. Diese Enzyme aktivieren wiederum

Transkriptionsfaktoren, welche die Expression verschiedener Gene stimulieren, die in die T-Zell-Immunantwort involviert sind (modifiziert nach (Murphy et al 2009).

1.5.2 Kostimulation

Die Signalgebung, die bei Erkennung eines spezifischen Antigens über den TZR-Komplex (Signal 1) erfolgt, reicht alleine nicht aus, um die Aktivierung naiver T-Zellen auszulösen. Hierzu wird ein weiteres Signal (Signal 2) über Wechselwirkung eines kostimulatorischen Rezeptors, z.B. CD28 auf der T-Zelle, mit seinen Liganden, z.B. CD80 und CD86 auf den APZ benötigt. Somit wird sichergestellt, dass nur „professionelle“ APZ mit passendem Peptid:MHC-Komplex und gebundenem Ligand, naive T-Zellen aktivieren können. CD28-vermittelte Signale unterstützen die T-Zell-Proliferation, Zytokinproduktion und das Überleben der Zellen. Fehlt das kostimulatorische Signal 2, gehen die T-Lymphozyten in einen Zustand der Anergie über oder werden apoptotisch (Acuto and Michel 2003, Boise et al. 1995, Harding et al. 1992, Murphy et al 2009, Mueller et al. 1989, Radvanyi et al. 1996). Durch die Ligandenbindung an CD28 werden Tyrosinreste in dessen zytoplasmatischer Domäne phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und des Adapterproteins Grb2 (engl. growth factor receptor bound protein 2). PI3K wiederum aktiviert, durch Phosphorylierung von PIP₂, die Serin/Threonin-Kinase Akt (= Proteinkinase B, PKB), welche durch konsekutive Phosphorylierung verschiedener Substrate zahlreiche Zellantworten reguliert. Über Aktivierung von Akt wird u.a. der Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert, der zur Expression anti-apoptotischer Proteine (z.B. Bcl-X_L) führt und die Expression der IL-2 mRNA verstärkt (Acuto and Michel 2003, Boise et al. 1995). Auch die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs über Grb2 kann zu einer erhöhten IL-2-Produktion führen, wodurch die T-Zell-Proliferation stimuliert wird. Eine Kostimulation über CD28 verstärkt das TZR-Signal auch bei niedrig-affiner Peptid:MHC-Wechselwirkung und unterstützt durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und Ap-1 die Produktion von IL-2 (Kane et al. 2002, Wingren et al. 1995). Ein weiterer gut charakterisierter, auf T- und NK-Zellen exprimierter kostimulatorischer Rezeptor ist das zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende CD2-Protein (Meuer et al. 1984, Moingeon et al. 1989, Selvaraj et al. 1987). Eine Bindung an den entsprechenden APZ-Liganden CD58 (LFA-3, engl. leucocyte function associated antigen 3) verstärkt die T-Zell-Aktivierung (Meuer et al. 1984, Moingeon et al. 1989) und erleichtert die Adhäsion und Interaktion von T-Zellen und APZ (Davis and van der Merwe 1996). Wird die Bindung von CD58 an CD2 durch Antikörper blockiert, wird die Bildung der Immunologischen Synapse inhibiert. Bemerkenswert ist, dass unter gleichzeitiger

Verwendung dreier verschiedener Antikörper gegen CD2 eine vollständige T-Zell-Aktivierung, ohne das TZR-Signal (alternativer Weg der T-Zell-Aktivierung), ausgelöst werden kann (Meuer et al. 1984).

Eine Kostimulation über CD2 oder CD28 führt über die Aktivierung des Aktin-bindenden Proteins Cofilin zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Samstag and Nebl 2005). Dies ist entscheidend für eine vollständige T-Zell-Stimulation, da hierdurch die Signalproteine und Rezeptoren (wie CD2 und CD28) während eines Kontakts zwischen T-Zelle und APZ zusammen mit dem TZR an der IS angereichert werden und die IS im weiteren Verlauf der für die vollständige T-Zell-Aktivierung protrahierten Interaktion zwischen T-Zelle und APZ stabilisiert wird (Burkhardt et al. 2008, Samstag et al. 2003).

Weitere Ko-Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie sind CTLA-4 (engl. cytotoxic lymphocyte antigen 4) und PD-1 (engl. programmed death 1), die im Gegensatz zu CD28 oder CD2 eine inhibierende Wirkung auf die T-Zell-Stimulation ausüben. Diese Rezeptoren sind wichtig für die Regulation der Immunantwort (Smith-Garvin et al. 2009). Die Bedeutung der negativ-regulatorischen Funktion von CTLA-4 zeigt sich bei CTLA-4-defizienten Mäusen, die ein letales lymphoproliferatives Syndrom entwickeln (Waterhouse et al 1995).

1.6 Das Aktin-Zytoskelett

Das Zytoskelett der T-Zelle ordnet sich abhängig von Prozessen wie Zirkulation, Migration und T-Zellaktivierung, ständig neu an und spielt daher eine entscheidende Rolle im Rahmen von Immunantworten. Die Bestandteile des T-Zell-Zytoskeletts sind Aktin-Filamente, Mikrotubuli und Intermediär-Filamente. Das Aktin-Zytoskelett reguliert die Zellmorphologie, ist an intrazellulären Transport- und Signalprozessen beteiligt und ermöglicht die Zellfortbewegung. Bei jeder Zellpolarisation werden Aktin-Filamente auf einer Seite der Zelle abgebaut und auf einer anderen Seite aufgebaut. Im Folgenden werden die Schritte dieses Kreislaufs und der daran beteiligten Proteine beschrieben (Mullins et al. 1998, Pollard et al. 2000, Samstag et al. 2003).

Aktin ist eines der am stärksten exprimierten Proteine in eukaryotischen Zellen und hat ein Molekulargewicht von 43 kDa. Es liegt in der Zelle, entweder an ATP- oder ADP-gebunden als globuläres Monomer (G-Aktin) oder als filamentöses Polymer (F-Aktin) vor. Jedes Aktin-Filament besitzt ein schnell wachsendes Plus-Ende und ein langsamer wachsendes

Minus-Ende. Das Filament-Wachstum (Polymerisation) wird unter anderem durch Kontrolle der G-Aktin-Konzentration gesteuert. In der Zelle liegt ATP-gebundenes G-Aktin als großer Vorrat, an die Proteine Thymosin- β 4 und Profilin gebunden, vor. Der G-Aktin-Thymosin- β 4-Komplex dient als reiner Monomer-Speicher, wohingegen Profilin-gebundenes Aktin an das wachsende Plus-Ende bestehender Filamente angelagert werden kann (Gomez-Marquez et al. 1989, Hartwig et al. 1989, Samstag et al. 2003). Beide Proteine haben eine höhere Affinität zu ATP-Aktin als zu ADP-Aktin. Da Profilin durch Anlagerung von ATP-G-Aktin an Aktin-Filamente ohne Stimuli die Polymerisation auslösen kann, müssen die Plus-Enden durch sogenannte Capping-Proteine (CapZ, Gelsolin) geschützt werden (DiNubile et al. 1995).

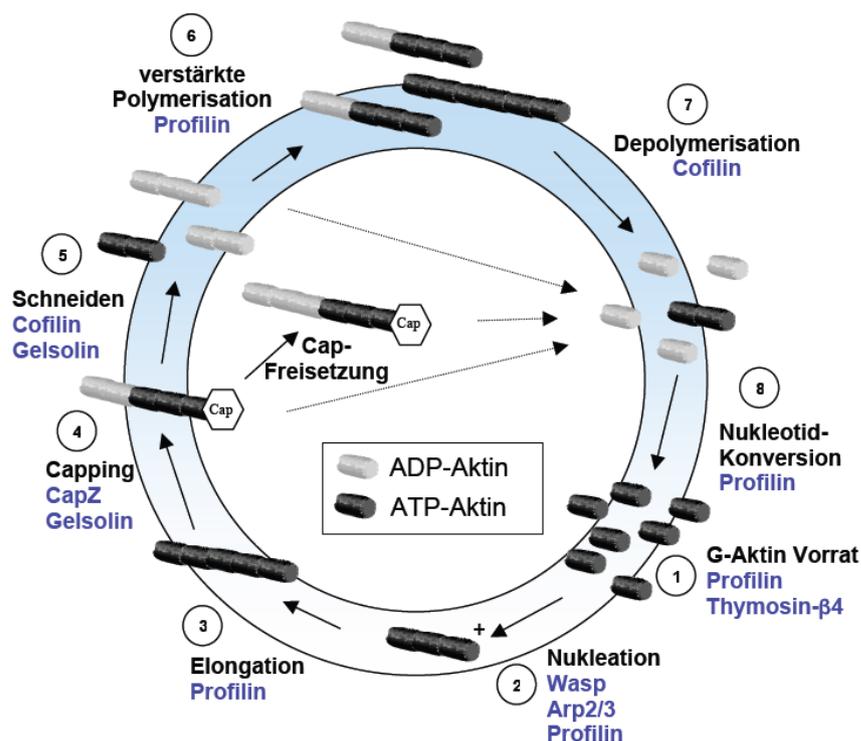


Abb.1.6: Der dynamische Aktin-Kreislauf. Bei diesem Kreislauf sind die wichtigsten Schritte bei der Aktinpolymerisation und Depolymerisation mit den beteiligten Aktin-bindenden Proteinen (in grauer Schrift) aufgezeigt. ATP-gebundenes Aktin wird durch dunkle Moleküle symbolisiert, die ADP-gebundenen Moleküle älterer F-Aktinfilamente sind hell dargestellt. Das + Zeichen ist einmal dargestellt, um das schnell wachsende Ende zu kennzeichnen (Modifiziert nach Samstag, 2003). Eine detaillierte Beschreibung des Aktin-Kreislauf befindet sich im Text.

Zur Generierung neuer Aktin-Filamente (Nukleation) wird ein aus 7 Untereinheiten bestehender Protein-Komplex benötigt, der sogenannte Arp2/3-Komplex (engl. actin related proteins) (Machesky et al 1994, Svitkina et al 1999). Initiiert wird die Nukleation durch Bindung des WASP (engl. Wiskott Aldrich Syndrom Protein) an den Arp2/3-Komplex, der dadurch aktiviert wird. Die folgende Polymerisation läuft spontan ab, wobei profilungebundene Aktin-Monomere mit dem WASP/Arp2/3-Komplex assoziieren. Dies führt zu einer Aktin-Polymerisation, die durch Anlagern von Capping-Proteinen an die freien Plus-Enden wieder gestoppt wird. Eine weitere Verlängerung (Elongation) der Filamente kann nur dann erfolgen, wenn die Capping-Proteine durch geeignete Stimuli entfernt oder die F-Aktin-Stränge geschnitten werden und somit wieder freie Plus-Enden zur Verfügung stehen. Letzterer Mechanismus wird durch das Aktin-bindende Protein Cofilin vermittelt. Beim Schneiden eines F-Aktin-Strangs entstehen mehrere kürzere Aktin-Filamente mit freien Plus-Enden, wodurch es erneut zu einer verstärkten Polymerisation kommen kann. Cofilin kann F-Aktin jedoch auch depolymerisieren, in dem es die zu ADP hydrolysierten und somit markierten, älteren Monomere am Minus-Ende abbaut und in den G-Aktin Vorrat entlässt (Chan et al. 2000, Du and Frieden 1998, Ichetovkin et al. 2002, Samstag et al. 2003). Die (ADP)-G-Aktin-Monomere werden durch Bindung von Profilin erneut zu (ATP)-G-Aktin/Profilin-Komplexen, die wieder für die Nukleation bereitstehen. Profilin konkurriert mit Thymosin- β 4 um (ATP)-G-Aktin und kann dieses aus dem Thymosin- β 4/Aktin-Komplex lösen und an den freien Plus-Enden anhängen (s. Abb.1.6) (Pantaloni and Carlier 1993, Pollard and Cooper 1986). Aktin-Filamente bilden ein dichtes Netzwerk an zytoskelettalem Aktin. Wasp/Arp2/3-Komplexe können die Nukleation auch an den Seiten bestehender F-Aktin-Stränge auslösen, so dass Filament-Verzweigungen mit einem Winkel von 70° und folgend ganze Netzwerke entstehen können. Aktinbündelnde Proteine wie Plastin, Fascrin und α -Actinin können parallel Bündel von Aktin-Filamenten erzeugen, wobei α -Actinin die Filamente auch quervernetzen kann (Samstag et al. 2003).

Eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist u. a. bei der T-Zell-Aktivierung für die Ausbildung der IS erforderlich. Im Folgenden wird beschrieben, in welcher Weise das Aktin-Zytoskelett durch T-Zell-Aktivierung verändert wird und welche Proteine bei dieser Signaltransduktion involviert sind. Bei Aktivierung bindet Vav, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, an das Adapterprotein SLP76 und wird anschließend, über Phosphorylierung durch ZAP-70 und Fyn, aktiviert (Fischer et al. 1998a, Valensin et al. 2002). Die Aktivierung von Vav führt wiederum zur Regulation und Aktivierung von G-

Proteinen der Ras-Superfamilie wie Rac1, Rho und Cdc42, die über das Aktin-Zytoskelett die Zellmorphologie beeinflussen. Rac1 und Cdc42 induzieren neue Aktin-Polymerisationen an der Zellfront, wobei sich Membran-Ausstülpungen (Lamellipodien) und größere filopodienartige Ausstülpungen bilden, während Rho die Ausbildung von Stressfasern reguliert (Fischer et al. 1998b). Cdc42 aktiviert außerdem den Arp2/3-Komplex (Kenney et al. 1986, Rivero-Lezcano et al. 1995). Dies geschieht über WASP, das in unstimulierten Zellen durch eine cis- oder trans-Bindung zweier eigener Regionen in einem inaktivem Zustand gehalten wird, und über Bindung an das Adaptorprotein Nck an die Membran rekrutiert wird. Dort löst Cdc42 die Auto-Inhibition, wodurch der Arp2/3-Komplex an der Zellmembran nahe des TZR aktiviert wird und somit für eine gerichtete Aktin-Polymerisation sorgt (Cannon et al. 2001, Kim et al. 2000, Rohatgi et al. 2000). Die dabei entstehenden Filamente werden über Membran-Ankerproteine wie Talin und Vasculin, an der Plasmamembran befestigt. Diese Membran-Anker binden auch an das bereits erwähnte Vav (Fischer et al. 1998b). Wenn die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin B, welches zur Aktin-Depolymerisation führt, gestört wird, kann sich keine Immunologische Synapse ausbilden (Cooper 1987).

1.7 Arginase: Ein Enzym des Harnstoffzyklus und der Immunregulation

Die Arginase ist ein hydrolytisches Enzym, welches für die Verstoffwechslung von L-Arginin, einer semiessentiellen Aminosäure, zu Ornithin und Harnstoff verantwortlich ist. Das in Prokaryonten und Eukaryonten exprimierte Enzym liegt zumeist als trimere Komplex aus identischen Untereinheiten vor. Im katalytischen Zentrum jeder Untereinheit befinden sich zwei Mangan-Ionen (Kanyo et al. 1996). Beim Menschen existieren zwei Isoenzym-Varianten, die zu 58% in ihrer Sequenz übereinstimmen und dieselbe biochemische Reaktion katalysieren. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer zellulären Expression, Regulation und subzellulärer Lokalisation. Eine der Isoformen ist die zytosolisch gelegene Arginase I (L-Arginin Ureahydrolase), welche im hepatischen Harnstoffzyklus eine wichtige Rolle spielt, indem sie an der Detoxifikation des entstehenden Proteinabbauprodukts Ammoniak beteiligt ist (Abb. 1). Die zweite Isoform Arginase II kommt in Mitochondrien vor, und wird vor allem in extrahepatischen Geweben wie Gehirn, Niere, Prostata und Dünndarm exprimiert. Das durch Verstoffwechslung von L-Arginin entstehende Ornithin ist an einer Vielzahl von Stoffwechselwegen beteiligt.

Einerseits kann Ornithin über das Enzym Ornithin Decarboxylase (ODC) weiter zu Polyaminen wie Putrescin, Spermidin und Spermin, die in zahlreichen zellulären Funktionen (z.B. Proliferation, Zelldifferenzierung) involviert sind, verstoffwechselt werden. Andererseits kann das Enzym Ornithin-Aminotransferase (OAT) Ornithin in Prolin, einen essentiellen Bestandteil des Kollagens, metabolisieren (Abb. 1.7.1).

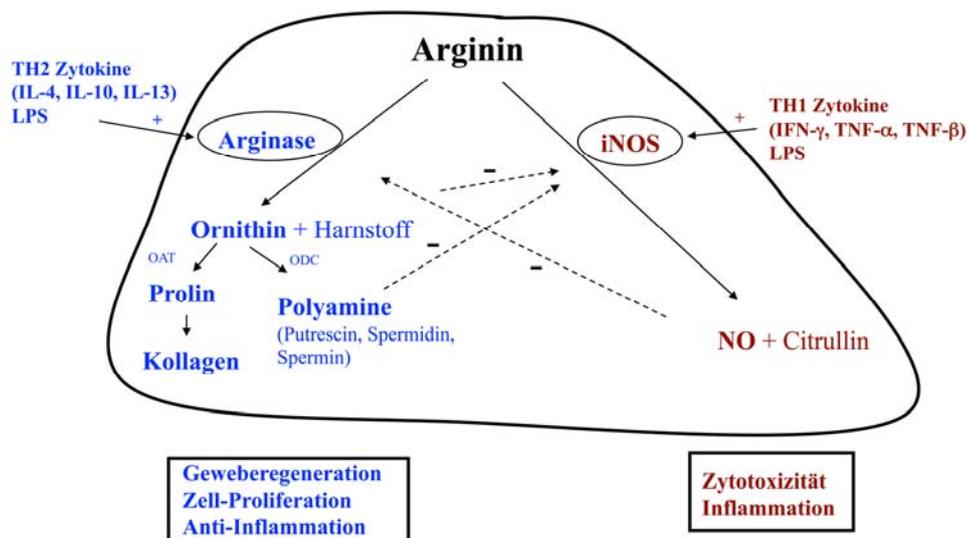


Abb.1.7.1: Regulation und Folgeprodukte des Argininstoffwechsels in murinen Makrophagen. Dargestellt sind wichtige Folgeprodukte, die bei der Verstoffwechslung von Arginin entstehen und die Enzyme und Proteine, die diesen Vorgang induzieren. (iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxydsynthase; NO: Stickstoffmonoxid; OAT: Ornithinaminotransferase; ODC: Ornithindecarboxylase).

Alternativ kann Arginin in einem weiteren Stoffwechselweg durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) zu Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin metabolisiert werden (Bogdan 2001). Citrullin, ein weiteres Produkt der NOS, kann durch die Enzyme Argininosuccinat Synthase (ASS) (DiNubile et al.) und Argininosuccinat Lyase (ASL) wiederum zu Arginin synthetisiert werden (Morris et al. 2003) (Abb.1.7.2). Die Regulation der beiden Arginin-metabolisierenden Enzyme Arginase und iNOS wird in murinen myeloischen Zellen durch die T-Zell-Zytokinexpression gesteuert. Während die Expression der induzierbaren NOS (iNOS) durch T_H-1-Zytokine wie IFN-γ hochreguliert wird, erfolgt eine Induktion der Arginase durch die T_H-2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13. Bei der NOS-vermittelten NO-Synthese entsteht das Zwischenprodukt N^G-Hydroxyl-L-Arginin (NOHA), das die ko-

exprimierte Makrophagen-Arginase inhibieren und dadurch die Menge des gemeinsamen Substrates Arginin für die NO-Produktion steigern kann (Hecker et al. 1995).

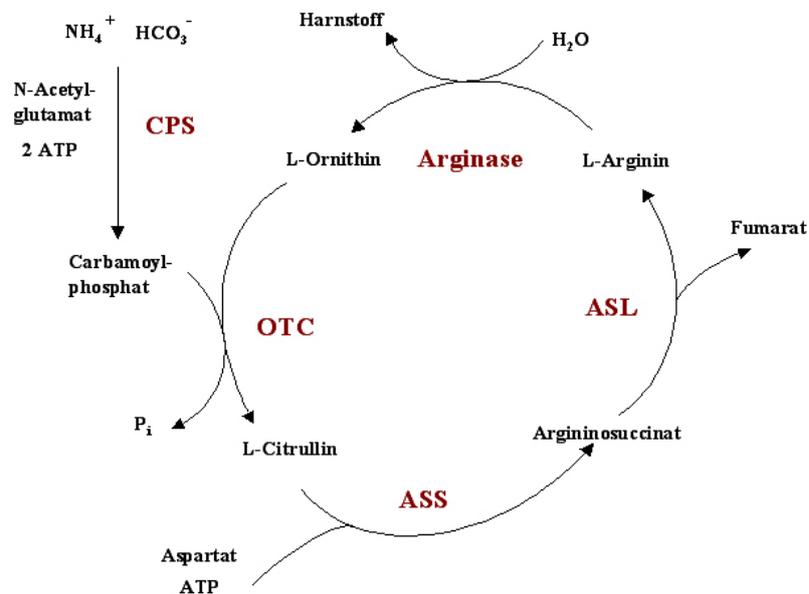


Abb.1.7.2: Arginase als Teil des Harnstoffzyklus. ASL: Argininosuccinat Lyase; ASS: Argininosuccinat Synthase. CPS: Carbamoylphosphat Synthase. OTC: Ornithin Transcarbamoylase

1.8 Die Bedeutung und Funktion der Arginase I im Immunsystem

Arginase I wird im murinen Immunsystem im Zytosol von Granulozyten, Makrophagen und DZ induzierbar exprimiert (Munder et al. 1998; Munder et al. 1999). Die Expression der Enzyme Arginase I und iNOS wird in Makrophagen über T-Zell-Zytokine dichotom reguliert (s.1.7). Die Induktion von iNOS über $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokine führt somit zur NO-vermittelten Zytotoxizität und Aktivierung der zellulären Immunantwort, wohingegen die Induktion von Arginase über $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokine an Geweberegeneration, Wundheilung und Fibrosierungsvorgängen beteiligt ist (Bronte and Zanovello 2005). In verschiedenen murinen Krankheitsmodellen konnte die dichotome Regulation der beiden Arginin-verstoffwechelnden Enzyme mit dem Verlauf der Krankheit korreliert werden. Diese Verbindung zeigte sich z.B. in Modellen der viralen Infektion (Mistry et al. 2001), der

Sepsis (Carraway et al. 1998), bei Asthma bronchiale (Meurs et al. 2002) und Tumoren (Bronte et al. 2003b, Liu et al. 2003, Sinha et al. 2005).

Im Rahmen entzündlicher Aktivität zeigt sich die Funktion der Arginase in murinen Makrophagen deutlich, da das Enzym durch Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoproteine induziert wird (Corraliza et al. 1995).

Das immunsuppressive Wirkprinzip der Arginase myeloischer Zellen wurde bereits vor mehr als 30 Jahren beschrieben. Die Zugabe myeloischer Zellen aus dem Peritoneum von Mäusen zu einer murinen gemischten Lymphozytenkultur supprimierte die Zytotoxizität der murinen Milzzellen. Dies ging einher mit einer induzierten Expression von Arginase in den Peritonealzellen/ Makrophagen und mit einer vollständigen Verstoffwechslung von Arginin im Zellkulturmedium der supprimierten Lymphozytenkultur (Kung et al. 1977).

Im Menschen konnte das Arginase-Protein und dessen Aktivität in der mononukleären (engl. peripheral blood mononuclear cell, PBMC) Zell-Fraktion chirurgischer Patienten nach schweren Verletzungen nachgewiesen werden (Ochoa et al. 2001). Das Enzym wurde u.a. auch in aktivierten Monozyten von Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Rouzaut et al. 1999), in Entzündungszellen der Bronchoalveolarflüssigkeit von Asthmatikern (Zimmermann et al. 2003), sowie in der PBMC-Fraktion von Patienten mit aktiver Lungentuberkulose nachgewiesen (Zea et al. 2006).

Munder et al. konnten erstmals zeigen, dass hohe Aktivitäten der hepatischen Isoform Arginase I bereits in ruhenden, humanen neutrophilen Granulozyten (engl. polymorphonuclear neutrophils, PMN) exprimiert werden (Munder et al. 2005). Im Gegensatz zum murinen Immunsystem, konnte in humanen monozytären Zellen (Makrophagen oder DZ) weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand, Arginase I nachgewiesen werden. Die gemessene Arginase-Aktivität in humanen PMNs liegt im Mittel bei 1600 mU/mg Protein und entspricht etwa der Aktivität in einer Leberzelle (Munder et al. 2005). Sehr hohe Arginase-Aktivitäten von ca. 40.000 mU/ml können auch in zellfreiem Überstand aus humanem Eiter chirurgischer Patienten gemessen werden (Munder et al. 2006), wobei die im Rahmen der Eiterbildung zerfallenden humanen PMN als wahrscheinliche Quelle der Arginase I angesehen werden.

1.9 Die Bedeutung der Arginase bei der Immunantwort gegen Tumoren

Tumoren haben spezifische, sogenannte *tumor immune escape* Mechanismen entwickelt, um der antitumoralen Immunantwort effektiv zu entgehen. Hierbei ist die Immunsuppression in der direkten Umgebung des Tumors von großer Bedeutung, von der wesentlich auch infiltrierende T-Lymphozyten betroffen sind. Die Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Tumorzellen kann einerseits zur Zerstörung des Tumors führen, andererseits aber auch zur Förderung des Tumorwachstums beitragen (Lewis and Pollard 2006). Regulatorische T-Zellen, die ins Mikromilieu des Tumors einwandern, können z. B. die anti-tumorale Funktion infiltrierender zytotoxischer T-Zellen direkt hemmen (Curiel 2007). Weiterhin stellte sich die Einwanderung von Arginase-exprimierenden myeloischen Zellen in das Tumorstroma als ein essentieller Bestandteil des *tumor immune escape* heraus. In murinen Tumormodellen konnte eine gemischte Population myeloischer Zellen verschiedener Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Diese Zellen sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD11b und Gr-1 charakterisiert und können eine effektive Suppression von T-Zellfunktionen herbeiführen, weshalb sie auch als myeloische Suppressor-Zellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) bezeichnet werden (Rodriguez and Ochoa 2008, Serafini et al. 2006a). Die myeloischen Suppressor-Zellen exprimieren konstitutiv Arginase I und führen somit zu einer Arginin-Depletion im Tumormikromilieu (Bronte et al. 2003a, Gallina et al. 2006, Rodriguez et al. 2004, Serafini et al. 2006b). Humane Arginase-exprimierende myeloische Suppressor-Zellen konnten u.a. in Patienten mit Nierenzellkarzinom als Zellen mit variabler Expression monozytärer (CD14) oder granulozytärer (CD15) Marker charakterisiert werden. In Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten führen sie durch Arginin-Depletion zu einer verminderten Expression der TZR- ζ -Kette und somit einer Suppression der Immunantwort (Zea et al. 2005). Eine Suppression von einwandernden T-Zellen ins Tumorstroma wurde ebenfalls bei Patienten mit Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (Rodriguez et al. 2004), Prostatakarzinom (Bronte et al. 2005) und Multiplem Myelom (Serafini et al. 2006b) beschrieben.

1.10 Suppression der Immunantwort bei Arginundefizienz

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die durch Arginase induzierte Arginin-Depletion ein bedeutender Mechanismus der Entzündungs-vermittelten Immunsuppression ist. Ein Beispiel für eine Entzündungsreaktion, bei der Arginase zu

einer Hemmung der Immunantwort führt, ist Asthma (Zimmermann et al. 2003). Bei Tiermodellen und Patienten mit Asthma bronchiale wurde in den Atemwegen eine erhöhte Arginase-Aktivität sowie eine reduzierte Argininkonzentration festgestellt. Durch diese reduzierte Argininkonzentration in der Lunge können nur noch geringe Mengen an NO synthetisiert werden, da Arginin auch das Substrat für die NO-Synthase ist. Die lokale Arginindepletion führt via NO-Mangel konsekutiv zu einer Hemmung der Bronchialdilatation (Maarsingh et al. 2009, Ricciardolo et al. 2004). Zusätzlich kann die erhöhte Arginase-Aktivität durch reduzierte NO-Produktion und vermehrter Synthese von Ornithin über die Bildung von Kollagen und Prolin den fibrotischen Umbau der Lunge fördern (Zimmermann and Rothenberg 2006).

Bakterien und Parasiten haben sich den Effekt der Argininverarmung als Überlebensstrategie zunutze gemacht, indem sie ihre eigene Arginase oder die des Wirtes zur Depletion von L-Arginin verwenden (Vincendeau et al. 2003). *Helicobacter pylori* besitzt z.B. ein Gen (rocF), welches für eine konstitutiv exprimierte Arginase codiert, welche via Arginindepletion die Produktion von antibakteriellem NO durch die NO-Synthase in Makrophagen inhibiert (Gobert et al. 2001). Bei einer persistierenden Infektion mit Krankheitserregern wie z.B. Leishmanien, die bevorzugt Makrophagen befallen, kommt es durch eine erhöhte Arginaseexpression und folgende Arginindepletion im Mikromilieu des Infektionsherds zu einer lokalen Immunsuppression *in vivo*. Dies führt zu einer verminderten T-Zell-Immunantwort in den Läsionen der Patienten und somit zu einer reduzierten Bekämpfung des Parasiten, da die Wirtszellen aufgrund der induzierten Überexpression von Arginase weniger toxisches NO produzieren können und mehr Polyamine gebildet werden, welche die Proliferation des Parasiten fördern können (Bronte and Zanovello 2005, Muller et al. 2008). Die Hemmung der Arginase sowie die Injektion von Arginin hemmen diese Immunsuppression und resultieren in einer effizienteren Kontrolle der Parasitenvermehrung (Modolell et al. 2009).

Im Verlauf granulozytärer Entzündungen kommt es zum nekrotischen Zellzerfall der früh in das entzündete Gewebe eingewanderten humanen Granulozyten, bei der auch intrazelluläre Bestandteile freierwerden, bevor die Eliminierung durch Makrophagen erfolgt. Die hieraus resultierende lokale Verstoffwechslung der semiessentiellen Aminosäure Arginin zu Ornithin führt zur Argininverarmung im Mikromilieu von T-Lymphozyten. Durch den spezifischen Arginase-Inhibitor N- ω -Hydroxy-nor-L-Arginin (nor-NOHA) kann diese Reaktion vollständig gehemmt werden. Ausschließlich Arginin ist von einem enzymatischen Abbau durch intrazelluläre Granulozytenbestandteile betroffen, andere Aminosäuren sind unbeeinträchtigt (Munder et al., 2006). T-Zellen, die in einem Arginin-

defizienten Milieu aktiviert werden, sind vollständig in ihrer Proliferation und partiell in anderen Funktionen (z.B. Zytokinsekretion) gehemmt. Die Arbeitsgruppe Munder konnte zeigen, dass bei Aktivierung von T-Lymphozyten in Argininmangelmedium, die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR vermindert und die Expression von CD69 verstärkt wird. Zusätzlich wird die Expression der TZR- ζ -Kette reduziert und die Synthese des Zytokins IFN- γ signifikant gehemmt. Die Vitalität der Zellen ist in dem untersuchten Aktivierungszeitraum von 48 h jedoch nicht beeinflusst. Der Defekt bei Argininmangel ist vermutlich posttranskriptionell, da z.B. bei Suppression der IFN- γ -Synthese die mRNA-Transkriptmenge bei Fehlen von Arginin nicht reduziert ist. Bei Aktivierung der T-Zellen in Zellkulturmedium, welches mit humanem zellfreiem Eiterüberstand präinkubiert wurde (ein Modell für granulozytäre Inflammation in vivo) konnte durch die Arginase-induzierte Arginindepletion eine vergleichbare T-Zell-Suppression beobachtet werden (Munder et al. 2006).

Erstmals wurde diese spezifische Rolle der Aminosäure Arginin für die T-Zell-Aktivierung von der Arbeitsgruppe um Ochoa untersucht, die einen partiellen Verlust der TZR- ζ -Kette in humanen T-Lymphozyten bei Fehlen von Arginin beschrieben (Rodriguez et al. 2002). Weiterhin konnten sie zeigen, dass T-Zellen bei Argininabwesenheit in der G0-G1 Phase des Zellzyklus verharren, einhergehend mit einer fehlenden Hochregulation der Expression von Cyclin D3 und der Cyclin-abhängigen Kinase CDK4 (Rodriguez et al. 2007). Beim Menschen konnte bei Tumoren, Autoimmunität und chronischer Inflammation eine unvollständige T-Zell-Aktivierung in Assoziation mit einem partiellen Verlust der TZR- ζ -Kette beschrieben werden (Baniyash 2004). Bestimmte Mikroorganismen scheinen diesen Mechanismus der T-Zellsuppression durch Arginin-Defizienz als Abwehrstrategie gegen das (humane) Immunsystem zu nutzen. So verursacht beispielsweise eine Infektion mit *Helicobacter pylori* erhöhte Arginase-Spiegel mit konsekutivem Argininabbau. Dieser korreliert mit einer verminderten Expression der TZR- ζ -Kette und somit einer ineffizienten adaptiven Immunantwort sowohl in Jurkatzellen als auch in primären humanen T-Lymphozyten (Zabaleta et al. 2004). Der Argininmangel und die damit assoziierte Hemmung der T-Zell-Immunantwort ist auch beteiligt an der Suppression mütterlicher anti-fetaler Immunantwort während einer Schwangerschaft. Dies verhindert möglicherweise einen immunologisch vermittelten Abort in Versuchstieren (Weiner et al. 1996). Auch beim Menschen konnte zum Zeitpunkt der Geburt eine höhere Aktivität des Arginase-Proteins im peripheren Blut der Schwangeren sowie innerhalb der Plazenta nachgewiesen werden. Während die plazentar exprimierte Arginase vermutlich für die Verfügbarkeit von Polyaminen entscheidend ist, wird die Invasion von T-Lymphozyten über die lokale

Arginindepletion der von Granulozyten exprimierten Arginase unterdrückt (Kropf et al. 2007).

Ferner sind auch humane NK-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Infektions- und Tumorabwehr spielen und u. a. die Frühphase entzündlicher Reaktionen dominieren, bei Argininmangel teilweise in ihrer Funktion supprimiert. Im Gegensatz zu den T-Zellen reagieren diese jedoch deutlich weniger sensitiv auf Arginindefizienz (Proliferation: EC_{50} der NK-Zellen ca. 2 μ M, EC_{50} der T-Zellen ca. 20 μ M). Eine ungenügende Konzentration der Aminosäure Arginin im Mikromilieu der NK-Zellen führt, analog zur T-Zell-Suppression, zu einem nahezu vollständigen Proliferationsverlust und einer Hemmung der Zytokinsynthese (Oberlies et al. 2009). Letzterer Defekt wird vergleichbar mit der Suppression der T-Zell-Zytokine (Munder et al. 2006) auch bei NK-Zellen posttranskriptionell reguliert (Oberlies et al. 2009). Die beeinträchtigte Proliferation und Zytokinsynthese humaner NK-Zellen bei Argininmangel stellen möglicherweise einen anti-inflammatorischen Regulationsmechanismus gegen unkontrollierte NK-Zell-Aktivierung und –Expansion dar (Oberlies et al. 2009).

1.11 Bekannte Mechanismen der T-Zell-Suppression bei Aminosäuremangel

Um auf zellulären Stress wie Aminosäuredepletion reagieren zu können, haben einzellige Eukaryonten einen Mechanismus, die sogenannte „general control response“, entwickelt. Hierbei binden freie, d.h. nicht an Aminosäuren gebundene tRNA-Moleküle (welche indirekt den Pool intrazellulärer Aminosäuren widerspiegeln) in eine Bindungstasche des Proteins GCN2 Kinase. Dies führt zu einer Phosphorylierung und hierdurch bedingten Aktivierung von GCN2 (pGCN2) sowie nachfolgend über eine Phosphorylierung der α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors (eIF2- α) zu einer Hemmung von eIF2B und damit der Entstehung des 43S Pre-Initiations-Komplex (Met-tRNA, GTP, eIF2) und in der Folge zur Inhibierung der Translations-Initiation (s. Abb 1.11). Hierdurch wird die zelluläre Protein-Synthese gehemmt, während die Transkription von Genen der Aminosäure-Biosynthese verstärkt wird (Hinnebusch 1994). In Säugetierzellen werden verschiedene eIF2 α -Kinasen (u.a. auch GCN2) exprimiert, die durch unterschiedliche intrazelluläre Stressfaktoren aktiviert werden. Auch in humanen T-Lymphozyten kann die Expression von GCN2 nachgewiesen werden. Bei T-Zellen, die in Abwesenheit von Arginin *in vitro* stimuliert wurden, kann die phosphorylierte Form der GCN2-Kinase

detektiert werden. Dies deutet auf eine Beteiligung der GCN2-Kinase bei der Reaktion auf Argininmangel hin (Oberlies et al. 2009).

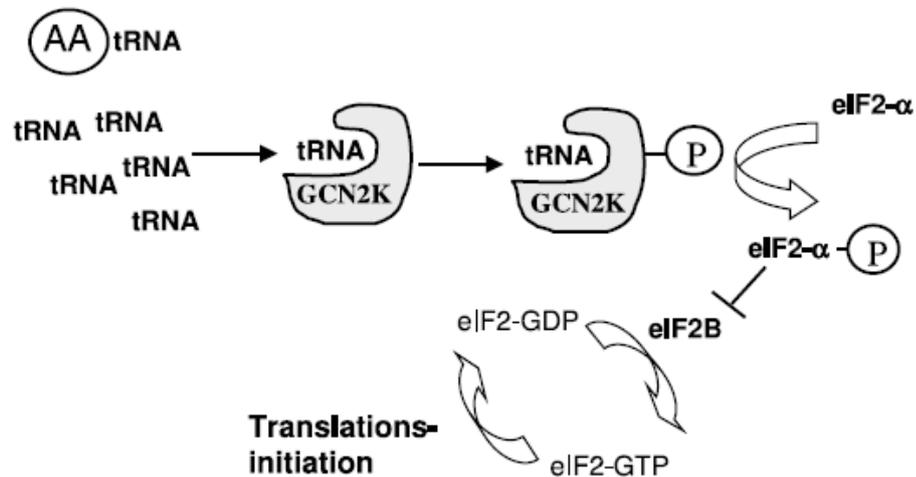


Abb. 1.11: Prinzip der GCN2-Kinase-Regulation bei Aminosäuremangel. Bei Aminosäuremangel entstehen unbeladene tRNAs und nachfolgend wird via Phosphorylierung der GCN2-Kinase und eIF2 α eine Hemmung der Translationsinitiation vermittelt (s auch Text).

Bei Aminosäuremangel werden in verschiedenen Zelltypen weitere Transkriptionsfaktoren wie ATF-2, ATF-4 und CHOP verstärkt exprimiert, sowie der mTOR (engl. mammalian target of rapamycin)-p70S6Kinase-Signaltransduktionsweg inhibiert (Averous et al. 2004, Rohde et al. 2001). Über Bindung an sogenannte AARE-Sequenzen (engl. amino acid response element) im Promotor der Transkriptionsfaktoren kommt es zu deren Aktivierung und in der Folge reagieren die Zellen mit einer Inhibierung des Zellzyklus auf einen Aminosäuremangel (Averous et al. 2004). Ferner führt die IL-13-vermittelte Induktion der Expression von Arginase I in murinen Makrophagen zu einer intra- und extrazellulären Arginin-Depletion und nachfolgend zur Inhibierung der iNOS-Translation (El-Gayar et al. 2003). Auch in Astrozyten ist die Translation der iNOS bei Argininmangel gehemmt. Diese Inhibierung wird durch Aktivierung der GCN2-Kinase mit konsekutiver Phosphorylierung von eIF2 α vermittelt (Lee J. et al. 2003). Ebenfalls wird durch Aktivierung der GCN2-Kinase, die zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors CHOP führt, die Proliferation muriner CD8⁺ T-Lymphozyten bei Tryptophanmangel, welcher durch das Enzym Indoleamin Dioxygenase (IDO) induziert wurde, gehemmt (Munn et al. 2005). Vermutlich

als ausgleichender Regulations-Mechanismus, führt Aminosäuremangel zusätzlich zur Induktion der Aminosäure-Transportproteine, CAT-1 und CAT-2, in der Zellmembran verschiedener Zelltypen (Aulak et al. 1999). Außerdem haben Säugetierzellen einen spezifischen Mechanismus entwickelt, mit dem sie über die Steuerung von micro-RNA auf Aminosäuremangel reagieren können. So wird in humanen Leberzell-Karzinomzellen bei Argininmangel durch Ablösen der an die CAT-1 mRNA gebundenen micro-RNA miR-122, welche eine Hemmung der Translation verursacht, die Induktion der CAT-1 Translation vermittelt (Bhattacharyya et al. 2006).

1.12 Ziel der Arbeit

Die Aminosäure Arginin ist fundamental an der Regulation der Immunantwort bei Infektionen, entzündlichen Erkrankungen und Tumorwachstum beteiligt. Arginindefizienz führt zur völligen Hemmung der Proliferation und zahlreicher Effektor-Funktionen aktivierter T-Lymphozyten (Munder et al. 2006). Bisher ist jedoch nur wenig darüber bekannt, welche intrazellulären Signalwege bei Argininmangel zur Inhibition der zellulären Funktionen im humanen Immunsystem führen.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, in primären humanen T-Lymphozyten Proteine zu charakterisieren, welche an der durch Arginin-Depletion hervorgerufenen T-Zellsuppression beteiligt sind. Aufgrund des posttranskriptionellen Defektes bei Argininmangel (Munder et al. 2006) sollte zunächst eine proteomische vergleichende Analyse humaner T-Lymphozyten bei Aktivierung in An- oder Abwesenheit von Arginin durchgeführt werden. Hierbei sollten insbesondere Proteine untersucht werden, die bei Argininmangel in humanen T-Lymphozyten vermehrt exprimiert werden. Nach 2D-Gelelektrophorese und Sequenzierung sollten funktionelle Untersuchungen die Rolle der identifizierten Proteine im Kontext der T-Zell-Aktivierung bei Argininmangel weiter klären.

Eine bessere Kenntnis der Regulationsmechanismen bei Argininmangel sowie die Identifikation zentraler „Schalter“ in humanen T-Lymphozyten sollte es ermöglichen, in unerwünschte Immunsuppression bei Tumorerkrankungen oder chronischer Inflammation kausal pharmakologisch eingreifen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Primäre humane T-Lymphozyten	s. Kapitel 3.2.1
Raji	Burkitt Lymphom B-Zellen
Jurkat	T-Zell-Lymphomzellen

2.1.2 Antikörper – FACS

Antikörper	Herkunft
anti- human CD3 PE	BD Pharmigen, Heidelberg
anti- human CD3 FITC	BD Pharmigen, Heidelberg
anti- human CD3 PerCP	BD Biosciences, Heidelberg
anti- human CD69 FITC	BD Biosciences, Heidelberg
anti- human CD69 PE	BD Biosciences, Heidelberg
anti- human IL-2 PE	BD Biosciences, Heidelberg
anti- human IFN γ FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (5(6)-CFDA), CFSE	Invitrogen, Karlsruhe
Indo 1-AM	Sigma, Steinheim
Isotypkontroll-Antikörper: muriner	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG2b-FITC	
Isotypkontroll-Antikörper: muriner	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG1-PE	

2.1.3 Antikörper – Western Blot

Alle Antikörper wurden in PBS + 5 % BSA und 0,1% Natriumazid verdünnt. Die Verdünnungen der Erst-Antikörper wurden bei 4°C gelagert und mehrfach verwendet.

Antikörper	Herkunft
Ziege-anti-Maus IgG-HRP (Sekundärantikörper)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP (Sekundärantikörper)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-phosho-Ezrin (Thr567)/Radixin (Thr564)/ Anti-Moesin (Thr558)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Moesin	Cell Signaling Technology, Danver, USA
Anti-Coronin 1a	Abcam, Cambridge, England
Anti- α -Tubulin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Vimentin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-pVimentin (Ser6)	Stressgen, Michigan, USA
Anti-Cofilin	Cell Signaling Technology, Danver, USA
Anti-pCofilin	Cell Signaling Technology, Danver, USA
Anti-ERK1/ 2 (K-23)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-pERK1/2	Cell Signaling Technology, Danver, USA

Anti-Akt	Cell Signaling Technology, Danver, USA
Anti-pAkt	Cell Signaling Technology, Danver, USA

2.1.4 Sonstige Antikörper

Antikörper	Herkunft
Ziege-anti-Maus IgG + IgM (Kreuzvernetzender Antikörper)	Dianova, Hamburg
Anti-CD3 (OKT3), monoklonaler Antikörper	Eigenherstellung, Institut für Immunologie Heidelberg, AG Samstag
Isotypkontroll-Antikörper: muriner IgG2a	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD28	BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

α -Isonitrosopropiophenon	Sigma, Steinheim
Acrylamide-Bisacrylamid Rotiphorese	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
Anti-CD3/CD28 microbeads, T cell expander	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-CD3/-CD28-gekoppelten paramagnetischen Kügelchen	eigene Herstellung in Kooperation mit der AG Samstag des Instituts für Immunologie, Heidelberg

Bovines Serum Albumin	Serva, Heidelberg
Bio-lyte® 3/10 Ampholyte	Biorad, München
Brefeldin A	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chaps	Sigma, Steinheim
Coomassie brilliant blue R	Serva, Heidelberg
CXCL12/SDF-1 α (Chemokin)	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
Destreak™ Reagent	GE Healthcare, München
Dialysiertes FCS	PAA, Pasching
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dualcolour Elektrophorese-Standard	Biorad, München
EDTA	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
ELISA Kit IFN- γ	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA Kit IL-2	BD Biosciences, Heidelberg
Entwickler, Reagenz A / B	Agfa, Mortsel, Belgien
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
FACSFlow™	Biorad, München
Fetales Kälberserum	PAN Biotech, Aidenbach
FicoLite H®	Linaris, Wertheim-Bettingen
Fixierer	Agfa, Mortsel, Belgien
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Gerbu, Gaiberg

Iodoacetamid	Sigma, Steinheim
Ionomycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
L-Arginin Hydrochlorid	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	Gibco - Invitrogen, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Steinheim
Molekulargewichts-Marker (Precisions Plus Protein™, All Blue Standard)	Biorad, München
Luminol	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem, Darmstadt
Manganchlorid (MnCl ₂)	AppliChem, Darmstadt
Methanol	JT Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Biorad, München
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt
Natriumheparin	Braun, Melsungen
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pervanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma, Steinheim
Natronlauge (NaOH)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
N-ω-Hydroxy-nor-L-Arginin (norNOHA)	Bachem, Ubendorf
ortho-Phosphorsäure 85 %	VWR Prolabo, Fontanay sous Bois, Frankreich
p-Coumarsäure	Sigma, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Dulbecco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin

PBS-Dulbecco Pulver für 10 l	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco - Invitrogen, Karlsruhe
Protein Assay, Reagenz A / B / S	Biorad, Hercules, USA
RPMI 1640-Medium argininfrei	PromoCell, Heidelberg
RPMI 1640-Medium	Gibco - Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	JT Baker, Deventer, Niederlande
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
Saponin	Sigma, Steinheim
Sample Buffer Laemmli (2 x)	Sigma, Steinheim
Schwefelsäure 96 %	Grüssing, Filsum
SEB	Sigma, Steinheim
Substrat Reagenz Set	BD Biosciences, Heidelberg
SYBRO [®] Ruby Protein Gel Stain	Biorad, München
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer, Zaventem, Belgien
Thio-Harnstoff	Sigma, Steinheim
³ H-Thymidin 5,0 Ci/mmol	Amersham Biosciences, Little Chalfont, GB
Tris, Pufferan [®]	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Tween [®] 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck, Darmstadt

2.1.6 Geräte und Laborausstattung

Aqua tridest Aufbereitungsanlage	Quantum EX(QTUM 000 EX), Millipore, Schwalbach
Autoklav Typ A5-70598	Webeco, Bad Schwartau
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank CO ₂ Inkubator	Sanyo, München
Cell Harvester 96	Tomtec, Hamden, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Cup loading Tray (für 2D-Gelelektrophorese)	Biorad, München
Dampfsterilisator Typ 300EC Varioklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Dynal MPC 2 (Magnet)	Dynal Biotech, Oslo, Norwegen
Eismaschine Typ AF 100	Scotsman, Milano, Italien
Eisschrank – 20°C	Liebherr Comfort, Ochsenhausen
Eisschrank – 80°C Ultra Low Freezer	New Brunswick Scientific, USA
Elektrophorese Einheit-SE 600, Protean2	Biorad, München
Electrophoresis Power Supply EPS 3500	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ELISA Lesegerät Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
Gamma Bestrahlungsanlage	STS Steuertechnik und Strahlenschutz GmbH, Braunschweig
Gelelektrophorese Kammer (Protean II Cell)	BioRad, München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg

ImageStream® (FACS-Gerät mit integriertem Mikroskop)	Amnis, Seattle, WA, USA
Kühlschrank 4°C	Liebherr Comfort, Ochsenhausen
Magnetrotator	IKA Combimag RCO IKA, Staufen
Microplate Scintillation Counter	Packard Instrument Co., Zaventem, Belgien
Mikroskop Zeiss ID02	Zeiss, Oberkochen
Minigelkammer (Mini-Protean II)	BioRad, München
Mini Zentrifuge	Qualitron inc, Korea
Minifuge RF	Heraeus Instruments, Hanau
Mixing Rotor	Renner GmbH, Dannstett
Multistep-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
pH-Meter-Typ CG 837	Schott, Mainz
Photoentwicklungskassette	Amersham Bioscience, Little Chalfont, GB
Photoentwicklungsmaschine CP 1000	Agfa, Mortsel, Belgien
Pipetboy acu Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten, einstellbar	Eppendorf, Hamburg und Gilson, Middleton, USA
ProteanXLSystem	Biorad, München
ReadyStrip IPG Strip, 11cm und 17cm	Biorad, München
Reinluftsterilbank LaminAir	Heraeus Instruments, Hanau
Schüttler Ultra Rocker	Biorad, München
Semi Dry Blotting Transferkammer	Biorad, München
Sepatech Megafuge 2.0R und 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Vortex-Genie 2	neoLab, Heidelberg/ Wellesley, USA
Wasserbad, Julabo U3	Buddeberg GmbH, Mannheim

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Adapter für S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Butterfly-21	Venisystems, Sligo, Irland
Combitips 0,5 ml steril	Eppendorf, Hamburg
Combitips 2,5 ml unsteril	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Platten (96 Loch)	Greiner, Frickenhausen
Filterplatten für Counter Unifilter-96 und Bodenverschlussfolien	PerkinElmer, Zaventem, Belgien
Flachbodenplatten 96 Loch Polystyrol	Greiner, Frickenhausen
HTS Transwell®- 96 Well Plate, 3µm	Corning, Amsterdam, Niederlande
Hybond TM und Hyperfilm TM	Amersham Bioscience, Little Chalfont, GB
Magnetsäulen MACS LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipetten Research®,	
Multistep-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, serologisch	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen Gelsaver	Kisker, Steinfurt
Polypropylen Röhrchen mit Schraub- verschluss, 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäß Cryo-Tube 1,5 ml	neoLab, Heidelberg
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen, 5 ml für die Durchflusszytometrie	BD Falcon, Bedford, USA
Spritzen 50 ml	BD Plastipak, Drogheda, Irland
Sterilfilter, 0,2 µm Porenweite	Whatman, Dassel
Verschlussfilme für Filterplatten	Perkin Elmer, Zaventem, Belgien
Verschlussfilme für Mikrotiterplatten	Roth, Karlsruhe

Whatman-Papier	Sartorius, Göttingen
Zählplatten	Hycor Biomedical, Garden Grove, USA
Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark

2.1.8 Software

Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc., Delaware, USA
CellQuest Pro	BD Bioscience, Heidelberg
Excel, Word, Powerpoint	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism 5.0	
Proteomweaver	Biorad, München

2.1.9 Medien

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde Aqua bidest. verwendet. Die Aufbewahrung aller Medien und Puffer, falls nicht anders deklariert, erfolgte bei 4°C in Dunkelheit.

Vollmedium

RPMI-Medium wurde mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin und 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum versetzt. Alle zugesetzten Substanzen wurden steril filtriert zugegeben.

Argininfreies Medium (Arg(-)Medium)

Argininfreies RPMI-Medium wurde mit 10 % dialysiertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % PenStrep und 10 µM MnCl₂ versetzt und sterilfiltriert.

Argininhaltiges Medium (Arg(+))Medium

Argininfreies RPMI-Medium wurde mit 10 % dialysiertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % PenStrep, 1 mM L-Arginin , und 10 μ M $MnCl_2$ versetzt und sterilfiltriert.

Waschmedium

Argininfreies Medium wurde mit 1% Penstrep versetzt und steril filtriert.

2.1.10 Puffer und Lösungen

T-Zellpuffer

PBS + 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

MACS-Puffer

PBS + 0,25 % humanes Serumalbumin

FACS-Puffer (intrazelluläre F-Aktinfärbung)

540 μ l PBS werden mit 60 μ l einer 10% Triton-X-100 Lösung und 400 μ l einer 12% PFA-Lösung versetzt.

FACS-Saponin-Puffer (intrazelluläre Färbung und Oberflächenfärbung)

Zu 500 ml PBS werden 25 ml filtriertes, hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 2,5 g BSA, 0,5 g Saponin und 3,5 ml 10% NaN_3 zugesetzt.

Paraformaldehyd (12%)

12 g Paraformaldehyd werden in 90 ml Millipore Wasser mit einem Tropfen NaOH versetzt und bei 62°C unter Rühren gelöst. Nach Abkühlung auf RT werden zu dieser Lösung 10 ml 10x PBS zugegeben, die Lösung wird filtriert und bei 4°C gelagert.

Erstantikörper-Puffer (ELISA)

8,4 g NaHCO_3 und 3,56 g Na_2CO_3 werden in 1 l H_2O gelöst, der pH-Wert kontrolliert und ggf. auf pH 9,5 eingestellt. Anschließend wird die Lösung bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt.

ELISA-Blockpuffer

(Puffer zum Verdünnen der Proben und zum Blockieren unspezifischer Bindungen) In 90 ml PBS werden 10 ml hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum gelöst (d.h. finale Konzentration: 10 %). Dieser Puffer wird erst direkt vor Verwendung hergestellt.

ELISA-Waschpuffer

0,05 % Tween-20 werden in PBS gelöst.

TKM-Lysepuffer

	Endkonzentration	Stock	5 ml Ansatz
Tris/HCL pH 7,5	50 mM	1M	250 μl
KCl	25 mM	1M	125 μl
MgCl_2	5 mM	1M	25 μl
Na_3VO_4	1 mM	100 mM	50 μl
NaF	5 mM	1000 mM	25 μl
Leupeptin	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 mg/ ml	100 μl
Aprotinin	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 mg/ ml	50 μl
NP40	1 %	10 %	500 μl

Thiourea-Laufpuffer

	Endkonzentration	Stock	2ml (6 Strips)
Urea-Thiourea-Stock	9 M	9,6 M	1890 μ l
Chaps	1 %	40 %	50 μ l
DTT	65 μ M	2,6 M	50 μ l
Ampholine (BioRad)	0,2 %	40 %	10 μ l

Thiourea-Stocklösung

2,252 g Urea und 0,837 g Thiourea und 2,5 ml Milliporewasser wurden in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben und bei 37°C gelöst.

Äquibrierungs-Puffer

Es werden 5,4 g Urea und 4,5 g Glycerol eingewogen mit 3 ml einer 10% SDS-Lösung und 501 μ l Resolving Gelpuffer versetzt und bis auf 15 ml mit Milliporewasser aufgefüllt. Der Ansatz muss bei 37°C gelöst werden und kann bis zu weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert werden. Als Resolving Gelpuffer wurde die Tris Lösung I für Western-Blot (s.u.) verwendet. Anschließend wurde dem Puffer ein wenig Bromphenolblau zugegeben, um später die Lauffront im Gel zu erkennen.

Tris-Lösung I (Trenngel-Tris)

Tris-Base 1,5 mol/l

SDS 0,4 %

91 g Tris wurden in 300 ml H₂O gelöst und der pH-Wert wurde mit einer 1 M HCl-Lösung auf 8,8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf ein Endvolumen von 500 ml mit H₂O aufgefüllt und 2 g SDS zugegeben. Zum Schluss wurde die Lösung steril filtriert.

Tris-Lösung II (Sammelgel-Tris)

Tris-Base	0,5 mol/l
SDS	0,4 %

6,05 g Tris wurden in 40 ml H₂O gelöst und der pH-Wert wurde mit einer 1 M HCl- Lösung auf 6,8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf ein Endvolumen von 100 ml mit H₂O aufgefüllt und 0,4 g SDS zugegeben. Zum Schluss wurde die Lösung steril filtriert.

Trenngel (12 % finale Acrylamidkonzentration)

<u>kleines Gel (10 ml)</u>	<u>großes Gel (25 ml)</u>	
<u>1 mm dick</u>	<u>1,5 mm dick</u>	
4 ml	10 ml	30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch I
2,5 ml	6,25 ml	Tris-Lösung I
3,5 ml	8,75 ml	H ₂ O
100 µl	250 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
6 µl	15 µl	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Sammelgel (5% finale Acrylamidkonzentration)

<u>kleines Gel (4 ml)</u>	<u>großes Gel (3 ml)</u>	
<u>1,5 mm dick</u>	<u>1 mm dick</u>	
0,665 ml	0,500 ml	30 % Acrylamid- Bisacrylamid-Gemisch
1 ml	0,75 ml	Tris-Lösung II
2,335 ml	1,75 ml	H ₂ O
40 µl	30 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
4 µl	3 µl	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

SDS-Laufpuffer (10 fach)

Tris-Base	30,26 g/l
Glycin	144 g/l
SDS	1 %

Es wurden 30,26 g Tris, 144 g Glycin und 50 ml einer 20 %igen SDS-Lösung miteinander vermischt und mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Zur Herstellung des einfach konzentrierten SDS-Laufpuffers wurde diese Stammlösung 1 : 10 mit Wasser verdünnt.

TBS (5 fach)

Tris-Base	50 mmol/l
NaCl	250 mmol/l

24 g Tris und 175,3 g NaCl wurden in 4 l H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl-Lösung (12 mol/l) auf 8,0 eingestellt.

TBST

1 l TBS (5 fach) wurde mit 4 l Wasser verdünnt. Anschließend wurden 0,5% Tween-20 zugegeben.

Western-Blot-Puffer

Tris-Base	5,82 g
Glycin	2,93 g
10 % SDS	3,75 ml
Methanol	200 ml

Zur Herstellung der Lösung werden die Bestandteile gemischt und mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.

Konservierlösung

Die Membranen werden in einer 0,1 % Natriumazidlösung in TBST aufbewahrt.

Blockpuffer

Zur Herstellung einer 5 % Magermilch-Blockpufferlösung werden 2,5 g Magermilchpulver in 50 ml TBST gelöst.

ECL-Reagenz

Stammlösungen

Menge

Zur Herstellung einer 250 mM-Lösung wurden 5 g Luminol (3-Amino-phthalhydrazid) in 113 ml DMSO gelöst.	0,5 ml
---	--------

Zur Herstellung einer 90 mM-Lösung wurde 1 g p-Coumarsäure (trans-4-Hydroxy-Zimtsäure) in 67,7 ml DMSO gelöst.	0,266 ml
---	----------

Eine einmolare Trislösung wurde mit HCL auf den pH-Wert 8,5 eingestellt.	5 ml
---	------

Diese drei Lösungen werden in den angegebenen Mengen gemischt, mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt und bei 4°C in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Direkt vor dem Einsatz als Reagenz werden zu 10 ml dieser Lösung 3,05 µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gegeben.

Boratpuffer

0,1M Borsäure pH 8,3

Lösungen zur Bestimmung der Arginaseenzymaktivität

Tris-HCl-Lösung

Zur Herstellung einer Tris-HCl-Lösung mit einer Konzentration von 50 mmol/l wurden 3,03 g Tris-Base in 500 ml H₂O gelöst und anschließend mit 5 mol/l HCL auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Manganchloridlösung (MnCl₂)

Zur Herstellung einer MnCl₂-Lösung von 10 mmol/l wurden 0,19 g MnCl₂ in 100 ml H₂O gelöst.

L-Argininlösung

Zur Herstellung einer L-Argininlösung mit einer Konzentration von 0,5 mol/l wurden 10,53 g L-Arginin in 100 ml H₂O gelöst und mit 5 mol/l NaOH auf einen pH-Wert von 9,7 eingestellt. Die Aufbewahrung der aliquoten Teile erfolgte bei -20°C.

Säuregemisch

Es wurden 320 ml H₂O mit 135 ml Phosphorsäure (H₃PO₄, 85 %) und 45 ml Schwefelsäure (H₂SO₄, 97 %) gemischt und bei 4°C gelagert.

α-Isonitrosopropiophenon-Lösung (ISPF-Lösung)

Zur Herstellung einer 6 % ISPF-Lösung wurden 3 g ISPF in 50 ml 100 % Ethanol gelöst.

Harnstoff-Stammlösung

Zur Herstellung der Harnstoff-Stammlösung von 600 µg/ ml wurden 60 mg Harnstoff in 100 ml H₂O gelöst. Die Aufbewahrung der aliquoten Teile erfolgte bei -20°C.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolierung primärer T-Lymphozyten

Primäre T-Lymphozyten wurden aus heparinisiertem Vollblut von freiwilligen gesunden Spendern beider Geschlechter gewonnen, die gemäß den institutionellen Richtlinien der Verwendung zu Forschungszwecken zustimmten. Der überwiegende Teil der Spender gehörte der Altersgruppe von 24 bis 35 Jahren an.

2.2.1.2 Isolierung Peripherer Blut Mononukleärer Zellen (PBMC)

Primäre PBMCs (im Wesentlichen Monozyten, NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten, selten Granulozyten-Verunreinigungen) wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation von frischem heparinisiertem Vollblut gesunder Spender gewonnen. Zunächst wurde das Blut in Aliquots zu 20 ml in je ein 50 ml Greiner-Röhrchen mit 15 ml T-Zellpuffer (PBS/ 2 mM EDTA) verdünnt. Zur Dichtegradientenbildung wurde mit 15 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet und bei 1280 g (ohne Bremse für 20 min bei RT) zentrifugiert. PBMCs

erschieden darauf als weißer Ring auf dem Ficoll-Gradienten, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sedimentierten. Die PBMCs wurden in ein neues Greiner-Röhrchen überführt, in das zuvor 10 ml T-Zellpuffer vorgelegt worden war und die PBMCs wurden mit 660 g für 15 min sedimentiert. Anschließend wurden die PBMC Aliquots in einem Greiner-Röhrchen vereinigt und weitere 2-mal mit T-Zellpuffer durch Zentrifugation (300 g für 10 min bei 4°C) gewaschen, um Ficollreste und Blutplättchen zu entfernen. Auf diese Weise standen aus 500 ml Vollblut je nach Spender zwischen 800 und 1200 Mio. PBMCs zur Verfügung. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer, wobei die Zellen 1:10 mit 2% Essigsäure verdünnt wurden.

2.2.1.3 Isolierung peripherer Blut-T-Lymphozyten

Primäre T-Lymphozyten wurden mittels T-Zell-Negativselektion über magnetische Kügelchen (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aus den PBMCs isoliert. Es wurde gemäß Protokoll des Herstellers gearbeitet. Die PBMCs wurden direkt nach Ermitteln der Zellzahl abzentrifugiert (300 g für 10 Minuten bei 4°C). Das Pellet wurde in MACS-Puffer resuspendiert (40 µl pro 10^7 Zellen), die der Zellzahl entsprechenden Menge (10 µl pro 10^7 Zellen) des Antikörpergemisches (biotin-konjugierte Antikörper gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glycophorin A) hinzupipettiert, gemischt und 10 min bei 4°C inkubiert. Hierbei wurden im Zellgemisch vorhandene Monozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten sowie verbleibende Granulozyten und Erythrozyten gezielt markiert. Anschließend wurde zu diesem Antikörper-Zellgemisch nochmals MACS-Puffer (30 µl pro 10^7 Zellen) und ein mit Magnetkügelchen gekoppelter Zweitantikörper gegen Biotin (20 µl pro 10^7 Zellen) hinzu gegeben und weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Diese Suspension wurde dann zum Waschen um das 10 – 20-fache Volumen mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und bei 300 g 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 3 – 6 ml MACS-Puffer (5×10^5 Zellen/ 3 ml) resuspendiert. Die nicht magnetisch markierten T-Lymphozyten wurden nun über MACS-Säulen (je 3 ml Zellsuspension/ Säule), welche in einen starken Magneten eingespannt wurden von den restlichen Zellen getrennt. Die erhaltene T-Zellsuspension wurde anschließend mit MACS-Puffer auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt. Ein Aliquot (90 µl) dieser Zellsuspension wurde mit 10 µl Trypanblau 1:10 gemischt und die Zellzahl mikroskopisch bestimmt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min. bei 300 g sedimentiert, in einer Dichte von 3×10^6 Zellen/ ml in Vollmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die aufgereinigten T-Lymphozyten

wurden dann bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank 1 – 5 Tage bis zur weiteren Verwendung in Kultur gehalten.

Die per Durchflußzytometrie bestimmte Reinheit betrug immer > 96 % CD3⁺- Zellen (s. Abb.).

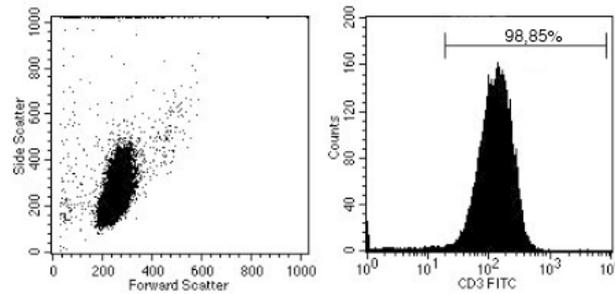


Abbildung: Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle aufgereinigter T-Zellen. Der Anteil der CD3⁺-Zellen ist in diesem Fall größer 98 %.

2.2.1.4 Kultivierung und Einfrieren von Lymphom-Zelllinien

Die Lymphom-Zelllinien Raji (B-Zell-Lymphom) und Jurkat (T-Zell-Lymphom) wurden mit einer Zelldichte zwischen 5×10^4 und 5×10^5 Zellen/ ml in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden in Vollmedium vermehrt und 2-mal pro Woche 1:5 mit Vollmedium verdünnt. Die Zellzahl und -vitalität wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Trypanblau-Lösung 1:2 verdünnt und ein Großquadrat ausgezählt (\Rightarrow Zellzahl/ ml = gezählte Zellzahl x Verdünnungsfaktor (hier: 2) x 10^4).

Zur Langzeitlagerung wurden 5×10^6 Zellen pelletiert, in 1 ml kaltem FCS + 10% DMSO aufgenommen und sofort in ein Kryo-Röhrchen (Nunc) überführt und für mind. eine Stunde bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C und zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryo-Röhrchen bei 37°C aufgetaut und der Inhalt in 50 ml warmes Vollmedium überführt. Nach anschließendem Waschen in Vollmedium wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen bei 37°C/5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.5 Einfrieren von Zellpellets

Die aufgereinigten T-Zellen wurden teilweise bis zur Lyse direkt als Zellpellets bei -80°C eingefroren. Dazu wurden $20 - 100 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert (240 g , 6 min bei 4°C), das Pellet in kaltem PBS resuspendiert, in ein $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.6 Herstellen der T-Zelllysate

Zum Herstellen der T-Zelllysate wurden die eingefrorenen Zellpellets bei RT aufgetaut und sofort in der entsprechenden Menge TKM-Lysepuffer resuspendiert, auf einem Vortex-Schüttler gemischt und für 1 h bei 4°C auf einem Schüttler lysiert. Falls möglich, wurden die Zellpellets nicht eingefroren, sondern sofort lysiert. Um auf eine Proteinkonzentration von $110\text{ }\mu\text{g}$ in höchstens $40\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer zu kommen (da ansonsten die Salzkonzentration in Kombination mit dem Laufpuffer zu hoch ist) mussten die in argininfreiem Medium stimulierten Zellen und die unstimulierten Zellen ($t=0\text{ h}$) im Verhältnis 400×10^6 Zellen/ ml und die in argininhaltigem Medium stimulierten Zellen in 150×10^6 Zellen/ ml lysiert werden. Zelltrümmer und Zellkerne wurden durch 15 min Zentrifugation mit 2850 g bei 4°C entfernt und der klare Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt und als Lysat verwendet. Hiervon wurden $5\text{ }\mu\text{l}$ für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Das Lysat wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.7 Herstellen der Proben für Western Blot Analysen

Zur Herstellung von Lysaten für eine Western Blot Analyse wurde die entsprechende Menge von den TKM-Lysaten (s. 3.2.1.6), die einer Proteinkonzentration von $20\text{ }\mu\text{g}$ entsprach, entnommen. Diese wurde im Verhältnis $1 : 1$ mit zweifach SDS (Sample Buffer) gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. Gleich anschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren oder in ein Polyacrylamidgel geladen und eine Gelelektrophorese durchgeführt (s. 3.2.7.1).

2.2.2 T-Zellstimulation

2.2.2.1 Standardansatz

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Stimulationsexperimente unter sterilen Bedingungen in 96-Loch-Rundbodenplatten durchgeführt. Es wurden jeweils pro Vertiefung 200 µl (+Arginin) oder (-Arginin)-Medium vorgelegt. In je 4 Vertiefungen (Stimulation mit Beads) oder 6 Vertiefungen (Stimulation mit APZ) wurden 1×10^6 primäre humane periphere Blut-T-Lymphozyten verteilt. Die B-Zellen wurden in den Ansätzen 1:2 ($1,6 \times 10^5$ T-Zellen : $1,6 \times 10^5$ B-Zellen/ 96-Well-Vertiefung) eingesetzt und auf je 6 Vertiefungen aufgeteilt, um eine Aktivierung der T-Zellen sicherzustellen und ein Überwachsen der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden in dieser Konzentration eingesetzt, da diese Zellzahl mindestens notwendig war, um die folgenden Messungen durchzuführen. Für jedes Experiment wurden die T-Lymphozyten und, wenn erforderlich, Raji Lymphom B-Zellen in gleicher Dichte als Kontrollen mitgeführt.

2.2.2.2 Stimulation von T-Zellen mit anti-CD3/-CD28-gekoppelten Partikeln

Zum Experimentansatz wurden im Verhältnis 1 : 5 (ein Partikel auf fünf T-Zellen) die mit anti-CD3 und anti-CD28 gekoppelten paramagnetischen Kügelchen (anti-CD3/-CD28-gekoppelte Partikel; anti-CD3/-CD28) hinzu gegeben. Diese aktivieren die humanen T-Zellen über den CD3-Komplex sowie als ein kostimulatorisches Signal über CD28.

2.2.2.3 Kurzzeitstimulation mit selbsthergestellten anti CD3/ anti-CD28-gekoppelten Partikeln

Kurzzeitstimulationen von 15 min bis 1h für Western Blot Analysen wurden mit selbsthergestellten anti-CD3/-CD28 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Yvonne Samstag (Institut für Immunologie der Universität Heidelberg) durchgeführt. Für die Kopplung wurden 3 µg Antikörper pro 25 µl Kügelchen (Menge: 1×10^7) verwendet. Zuerst wurden 300 µl Kügelchen in 1 ml Boratpuffer gewaschen. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß in einen Magneten gespannt und der Überstand abgesaugt. Boratpuffer, Metallkügelchen und Ziege anti-Maus IgG und IgM Antikörper (Dianova), wurden in oben genannter Konzentration zusammengegeben und 15 min bei RT auf dem Rotor inkubiert. Anschließend wurden 0,1% BSA zugegeben und 19 h bei RT auf dem Rotor inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde dann in den Magneten eingespannt und der Überstand abgesaugt. Es wurde 2 x für 5 min bei RT auf dem Rotor mit PBS/ 0,1% BSA gewaschen, für 5 min bei

430 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Metallkügelchen wurden in 300 µl PBS/ 0,1% BSA aufgenommen, die Zweitantikörper anti-CD28 (10 µg/ ml) und OKT3 (0,5 µg/ ml) zugegeben und für 1h bei RT auf dem Rotor inkubiert. Es wurde 2x mit PBS/ 0,1% BSA gewaschen und die Kügelchen in 300 µl des Waschpuffers aufgenommen. Für die Stimulationsansätze wurden je 30 µl Kügelchen für 5 Mio. T-Zellen in 150µl Medium verwendet. Die Zellen waren zuvor über Nacht in argininhaltigem oder argininfreiem Medium präinkubiert worden und auf 30×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Die Stimulation erfolgte für die verschiedenen Zeiten (15min, 30min und 1h) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 37°C auf dem Heizblock. Als Kontrolle wurden 3×10^6 T-Zellen ohne Kügelchen parallel zu den entsprechenden Zeiten inkubiert. Nach Inkubation wurde 1 x für 3 min bei 430 g mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 5×10^6 T-Zellen mit Kügelchen in 18 µl und die 3×10^6 T-Zellen ohne Metallkügelchen in 28 µl TKM-Lysepuffer aufgenommen. Nach 20 min Lyse auf Eis wurde der Zellschrott bei 24000 g für 15 min sedimentiert. Der Überstand abgenommen und mit 3 x SDS-Puffer versetzt, für 5 min bei 95°C aufgekocht und sofort auf das SDS-Gel aufgetragen oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2.4 Stimulation von T-Zellen mittels Antigenpräsentierender Zellen

Als antigenpräsentierende Zellen wurden Raji B-Zellen verwendet. Diese wurden vor jedem Einsatz zunächst in der Blutbank des Instituts für Immunologie mit 30 Gy Gammastrahlen bestrahlt, um deren Zellteilung zu hemmen. Vor Zugabe zum Stimulationsansatz wurden die Zellen mit dem Superantigen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) beladen. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert, das Zellpellet in Vollmedium in einer Zellkonzentration von $4 - 10 \times 10^6$ Zellen/ ml resuspendiert und das Superantigen SEB (finale Konzentration je 1 µg/ ml), zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen zweimal in argininfreiem Medium gewaschen, in der entsprechenden Menge argininfreien Mediums resuspendiert und mit dem Multistepper im Verhältnis T-Zellen/B-Zellen 1:2 (je 10µl/ Vertiefung; $1,6 \times 10^5$ B-Zellen) gleichmäßig in je 6 Vertiefungen verteilt. Als Kontrollen wurden B-Zellen ohne SEB-Präinkubation mit und ohne T-Zellen in das Assay eingesetzt.

2.2.2.5 Stimulation von T-Zellen in Anwesenheit von humanem Eiter

Um die *in vitro* gewonnenen Daten in einem *ex vivo* System zu überprüfen, wurde humaner Eiter verwendet. Der Eiter stammte aus Abszessdrainagen chirurgischer Patienten. Er wurde abzentrifugiert und anschließend aus dem zellfreien Überstand die Arginaseaktivität bestimmt (s.3.2.4). Die Eiterüberstände wurden bis zu einer Arginaseaktivität von 300 mU/ml in Arg(+)Medium verdünnt und das Arg(+)Medium für 12-16 h mit den verdünnten Eiterüberständen präinkubiert, damit das vorhandene Arginin umgesetzt werden konnte. Parallel erfolgte ein Versuchsansatz mit Eiterüberständen und 1 mM nor-NOHA, einem Arginaseinhibitor, um die Verstoffwechslung des Arginins zu verhindern. Zu den Standardansätzen mit anti-CD3/-CD28 Stimulation wurden dann 300 mU/ml Eiterüberstandssuspension mit oder ohne nor-NOHA hinzugegeben.

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um bei den Experimenten jeweils eine vergleichbare Menge an Protein einsetzen zu können, wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit einem kommerziellen *Protein Assay* (Biorad, München) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 5 µl der zu bestimmenden Zellysate entnommen, 1 : 4 mit dem jeweils verwendeten Lysepuffer verdünnt und in eine 96-Loch-Flachbodenplatte wurden pro Loch je 5µl Probe in Dreifachbestimmungen gegeben. Die Proteinstandardverdünnungsreihe wurde zweifach pipettiert. Proben und Standard wurden dann mit einem Gemisch aus Biorad-Reagenz A und S versetzt, und zusammen mit Biorad-Reagenz B für 20 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Messung erfolgte anschließend mit Hilfe eines ELISA-Lesegeräts bei einer Wellenlänge von 690 nm. Die Auswertung erfolgte anhand der Standardkurve.

2.2.4 Bestimmung der Arginaseaktivität von humanem Eiter

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl des zellfreien Eiterüberstands mit 20 µl MnCl₂-Lösung vermischt. Zur Aktivierung der Arginase wurde dieses Gemisch für 8 min auf 56°C erhitzt. Als Substrat wurden nun je 100 µl L-Argininlösung zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 120 min wurde die enzymatische Reaktion mit je 800 µl Säuregemisch abgestoppt. Parallel dazu wurden Harnstoff-Standardverdünnungen von 0-10 mmol/l in H₂O hergestellt und je 100 µl Lösung mit 900 µl Säuregemisch versetzt. Proben und Standards wurden anschließend mit je 40 µl α-Isonitrosopropiophenon-Lösung erst für 30 min bei 95°C und in einem weiteren Schritt für 30 min bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Je nach Harnstoffkonzentration entstand so eine rot-violette Farbreaktion

unterschiedlicher Intensität. Zur quantitativen Erfassung der Enzymaktivität wurden nun aus jedem Reaktionsgefäß 200 µl in eine 96 Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte überführt. Im ELISA-Lesegerät wurden diese Proben nun bei der Absorption von 540 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen, und anhand des Standards die Harnstoffkonzentration berechnet. Daraus ergab sich nun die Arginaseaktivität, denn eine Einheit (U) der Enzymaktivität ist definiert durch die Bildung von 1 µmol Harnstoff pro min.

2.2.5 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Analysen wurden mit einem LSR II, einem FACSCalibur und einem FACSsan (BD Bioscience) durchgeführt. Zur Geräteeinstellung (Kompensation) bei Mehrfarbenanalysen wurde für jeden verwendeten Fluoreszenz-Farbstoff ein Kontroll-Ansatz gemessen, für den ein stark exprimiertes Oberflächenmolekül gefärbt wurde (z.B. CD3 für T-Zellen). Anhand dieser Ansätze wurde die Farbkompensation eingestellt.

2.2.5.1 Nachweis zytokinproduzierender Zellen mittels intrazellulärer FACS-Färbung

Zum Nachweis der intrazellulären Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau, wurden die Zellen jeweils vier Stunden vor der Färbung mit Brefeldin A (10 µg/ml) behandelt, dass die Verschmelzung von endogenen Vesikeln mit der Zellmembran verhindert. Dadurch verbleiben die Zytokine im Prä-Golgi bzw. Golgi-Kompartiment intrazellulär und können über eine intrazelluläre Färbung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Für diese Messung wurden zunächst pro Ansatz 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen geerntet und mit 1560 g für 5 min bei RT sedimentiert. Zur Fixierung wurde das trockengesaugte Zellsediment in 100 µl vorgewärmten 4% Paraformaldehyd aufgenommen. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer mit 0,1% (w/v) Saponin gewaschen (Zentrifugation bei 1560 g, 5 min bei RT), nach wiederholter Zugabe von 2 ml FACS-Saponin-Puffer und 10 min Inkubation bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (Zentrifugation bei 1560 g, 5 min), der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in 50 µl FACS-Saponin-Puffer (FACS-Puffer/ 0,1% Saponin) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT, wurde 1 ml FACS-Puffer/ 1% Saponin pro Probe zugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurden nicht-gebundene Antikörper im Überstand der Zellen durch zweimaliges Waschen (Zentrifugation bei 1560 g für 5 min) mit FACS-Puffer und darauffolgendes Absaugen entfernt. Das Zellsediment wurde daraufhin in 150 µl FACS-

Puffer/ 0,1% Saponin aufgenommen und direkt danach gemessen oder in 200 µl PBS/ 1% Paraformaldehyd aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Die Messung erfolgte mit dem Durchflußzytometer FACSCalibur (Becton Dickinson).

Antikörpergemisch für die Bestimmung IL-2 produzierender Zellen: anti-IL-2-PE, anti-CD69-FITC, anti-CD3-PerCp; Isotypkontrolle: IgG₁-PE, anti-CD69-FITC, anti-CD3-PerCp.

Antikörpergemisch für die Bestimmung IFN γ produzierender Zellen: anti-IFN γ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD3-PerCp; Isotypkontrolle: IgG_{2b}-FITC, anti-CD69-PE, anti-CD3-PerCp.

2.2.5.2 Nachweis von filamentösem Aktin mittels intrazellulärer FITC-Phalloidin FACS-Färbung

Um den Gehalt an intrazellulärem filamentösem Aktin (F-Aktin) zu bestimmen, wurden die Zellen nach den verschiedenen Zeitpunkten (15 min, 30 min, 1 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h) in FACS-Röhrchen geerntet und mit FITC-markiertem Phalloidin - ein an F-Aktin bindendes Pilzgift - gefärbt. Für diese Färbung wurden je 5×10^5 – 1×10^6 Zellen je Ansatz in ein FACS-Röhrchen überführt, bei 1560 g für 5 min sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Für die F-Aktin-Bestimmung der frühen Zeitpunkte (15 min, 30 min und 1 h) wurden die T-Zellen über Nacht in argininhaltigem oder argininfreiem Medium präinkubiert, jeweils 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in je 90 µl argininhaltigem oder argininfreiem Medium resuspendiert und direkt in FACS-Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von SEB-beladenen Raji-B-Zellen (s. 3.2.2.4) bzw. antikörpergekoppelten Kügelchen (s. 3.2.2.2) für 30 sec bei 560 g zentrifugiert und für die genannten Zeiten bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Die Pellets wurden anschließend in je 100 µl argininfreiem oder argininhaltigem Medium resuspendiert und für 15 min bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert, da F-Aktin sehr anfällig auf Scheerkräfte reagiert. Nach dieser Ruhephase wurden je 100 µl Puffer mit FITC-Phalloidin (PBS/ 0,6% Triton X-100/ 4,8% PFA/ 0,05 mg/l FITC-Phalloidin/ 5µl anti-CD3-PE) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die Kontrollen wurden in 100 µl Puffer ohne Antikörper bzw. bei den Einstellkontrollen jeweils mit dem entsprechenden Farbstoff resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 700 g für 5 min sedimentiert, der Überstand abgesaugt und in 150 µl PBS (bei unmittelbarer durchflusszytometrischer Messung) oder in 200 µl PBS/ 1% PFA resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt, sofern erst später die durchflußzytometrische Analyse erfolgte. Die Messung wurde mit dem Durchflußzytometer FACSCalibur durchgeführt.

2.2.5.3 Bestimmung des Kalziumflux

Die intrazelluläre Kalziummenge der T-Zellen nach Stimulation, wurde anhand der unterschiedlichen Emissionsmaxima des INDO-1 Farbstoffs mittels des FACS-Geräts LSR II gemessen. Wird Kalzium freigesetzt, bindet INDO-1 daran und in der Folge ändert sich die Absorptionswellenlänge (395 nm) im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff (495 nm). Damit einher geht eine Veränderung der Fluoreszenzintensität, die als Quotient F395/F495 unabhängig von der Farbstoffbeladung der Zelle die Veränderung in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration anzeigt. Für diese Messung wurden zunächst je 1×10^7 Zellen über Nacht in argininhaltigem oder argininfreiem Medium präinkubiert, anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 390 g für 5 min sedimentiert. Das Pellet wurde in je 1 ml argininfreiem bzw. 1 ml argininhaltigem Medium resuspendiert und für 10 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Zu der Zellsuspension wurden nun je 2 µl des Kalzium-Indikatorfarbstoffs INDO-1 zugegeben und für 45 min im Wasserbad bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde 1 µl anti-CD3 (1 µg/ml) bzw. in einem separaten Ansatz 2 µl IgG2a (1 µg/ml) als Isotypkontrolle hinzugegeben und unter gleichen Bedingungen weitere 15 min inkubiert. Es folgte ein Zentrifugations- und ein Waschschrift (560 g, 5 min) bei dem mit je 1 ml argininhaltigem bzw. argininfreiem Medium gewaschen wurde. Die Zellpellets wurden dann in je 10 ml entsprechendem Medium resuspendiert und bis zum Ende der Messung im Wasserbad aufbewahrt. Zur Messung wurde je 1 ml der Zellsuspension entnommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Probe wurde sofort gemessen. Als erstes wurde das Grundlevel für 2 min gemessen. Das Röhrchen wurde wieder aus dem Gerät entnommen und es wurden 2 µl (3,6 µg/ml) kreuzvernetzender Ziege-anti-Maus-IgG+IgM-Antikörper zugegeben, gemischt und für weitere 3 min gemessen. Als Positivkontrolle wurde abschließend 1 µl Ionomycin (1 µM) hinzugegeben für maximalen Ca^{2+} Einstrom und erneut 1 min gemessen. Während des kompletten Vorgangs wurde die Messung nicht angehalten. Zwischen den einzelnen Proben wurde 1-mal mit FACSDifflow gewaschen. Die Ergebnisse wurden mit der Software FlowJo ausgewertet.

2.2.6 Proliferationsmessung

2.2.6.1 Einbau von [^3H]-Thymidin in die Zellen

Als Maß für die Induktion der Zellproliferation wurde die DNA-Synthese anhand von Tritium-Thymidin-Einbau in die DNA quantifiziert. Dazu wurden in einer 96 Loch-Rundbodenplatte 1×10^5 T-Zellen pro Vertiefung unter den Standardversuchsbedingungen

mit oder ohne Stimulation, je Bedingung in Triplikaten, bei 37° C inkubiert. Nach 48 h wurden dann pro Loch 50 µl Überstand vorsichtig abpipettiert und für Zytokinanalysen bei -20° C eingefroren. Die verbleibende Zellsuspension wurde für weitere 15 bis 18 h mit [³H]-Thymidin (gelöst in Arginin(-)Medium) in einer finalen Konzentration von 1 µCi/ ml pro Vertiefung inkubiert (Zugabe von 20 µl einer [³H]-Thymidin-Stammlösung (10 µCi/ ml). Die sich im Zellzyklus befindenden Zellen bauen hierbei das radioaktiv-markierte Thymidin in ihre DNA ein. Bei der anschließenden Ernte mit einem automatischen Zellerntegerät bleiben die Zellen auf dem Glasfilter hängen, und das nicht-inkorporierte [³H]-Thymidin wurde herausgewaschen. Die Radioaktivität der Filter wurde nun in einem Radioaktivzähler als Ereignisse pro Minute (counts per minute, cpm) gemessen. Diese korrelieren mit der DNA-Replikationsaktivität und somit mit der Proliferation der Zellen.

2.2.6.2 Durchflußzytometrische Messung der zellulären Proliferation mittels CFSE-Färbung

Für die Messung der Proliferation in Anwesenheit der Raji B-Zellen wurden die T-Zellen direkt vor dem Einsetzen in die Zellkultur und nach einmaligem Waschen mit PBS, für 15 min bei 37°C/ 5% CO₂ mit dem Fluoreszenzmarker CFSE (Carboxy-Fluoreszein-Succinimidyl-Ester) (finale Konzentration 0,5 µM in PBS) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 300 g für 5 min, wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Vollmedium resuspendiert und für 30 min bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligen Waschen in argininfreiem Medium wurden die markierten T-Zellen gleichmäßig verteilt und für 96 h bei 37°C/ 5%CO₂ stimuliert bzw. in Kultur gehalten (Kontrollansätze) (s.3.2.2). CFSE, das initial Membran-permeabel aber nicht fluoreszierend ist, diffundiert in die T-Zellen, wird intrazellulär durch Esterasen modifiziert und reagiert mit intrazellulären Amingruppen, so dass der nun fluoreszierende Farbstoff intrazellulär verbleibt. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff dann auf die beiden Tochterzellen verteilt. Die Fluoreszenz der Zellen nimmt dementsprechend um so mehr ab, je öfter sie sich geteilt haben. Am Ende der jeweiligen T-Zell-Kulturen (nach 96 h Inkubationszeit) wurden die Zellen im Durchflußzytometer (FACSan) analysiert und ein Proliferationsprofil der jeweiligen Population erstellt.

2.2.7 Bestimmung der Zytokinproduktion

Die Zytokinproduktion der T-Zellen in den verschiedenen Bedingungen wurde auf Ebene der Zytokinsekretion mittels ELISA und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hanns-Martin Lorenz (Medizinische Klinik 5, Universität Heidelberg) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde hierfür das Durchflusszytometer „EPICS XLTM flow cytometer“ und der "FlowCytomix Kit" (Bender MedSystems, Vienna, Austria) für eine parallele durchflußzytometrische Bestimmung von 15 Zytokinen verwendet (Heyder et al 2009).

2.2.7.1 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

Nach Stimulation der Zellen für verschiedene Zeiten wurden 50 µl des Zellkulturüberstands vorsichtig abgenommen, mit ELISA-Blockpuffer (PBS/ 10 % FCS) 1 : 1 – 1 : 20 je nach Bedarf verdünnt und die Menge an darin gelöstem Zytokin mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-System (BD Biosciences, Heidelberg) bestimmt. Dazu wurde der Erst-Antikörper (unmarkierter anti-Zytokin-AK) gemäß den Herstellerangaben in Erstantikörper-Puffer (s. 3.1.9) gelöst und während der Inkubation über Nacht bei 4°C auf 96 Loch-ELISA-Platten am Plattenboden gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer und kräftigem Ausklopfen wurden die Platten mit 200 µl pro Loch ELISA-Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Dieser Schritt sorgt dafür, dass alle unspezifischen Bindungsstellen am Erst-Antikörper und an der ELISA-Platte blockiert werden, und somit nur noch die spezifische Antigenbindungsstelle des Erst-Antikörpers zur Verfügung steht. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden je 50 µl der Standardverdünnungsreihe in Doppelansätzen bzw. je 50 µl der Probenverdünnung in Triplikaten auf die mit Erst-Antikörpern beschichteten Platten pipettiert und nochmals für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit können sich die in den Standard- bzw. Probenverdünnungen gelösten Antigene (d. h. die von den Zellen zuvor sezernierten, im Überstand befindlichen Zytokinmoleküle) spezifisch an die an der Platte gebundenen Antikörper in Form eines Antigen-Antikörper-Komplexes anlagern. Nach fünf weiteren Waschschrritten zur Entfernung von nicht gebundenem Zytokin und anderen Bestandteilen des Überstands wurden je 50 µl Detektionsgemisch pro Vertiefung zum Nachweis von gebundenem Zytokin in die ELISA-Platten pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Detektionsgemisch besteht aus einem biotinylierten Detektions-Antikörper, welcher spezifisch gegen ein anderes Antigen des Zytokins gerichtet ist als der Erst-Antikörper, und einer Streptavidin-konjugierten Meerrettich-

Peroxidase (HRP). Der Detektions-Antikörper bindet somit am plattengebundenen Zytokin, und Streptavidin assoziiert mit Biotin, sodass das Detektionenzym Peroxidase ebenfalls indirekt (und korrelierend zur Menge des gebundenen Zytokins) an der Platte gebunden vorliegt. Anschließend folgten weitere Waschschriffe, bevor eine Lösung aus Substrat A und B (ELISA-KIT) dazu pipettiert wurde. Das Enzym HRP oxidiert nun während der Inkubationszeit von 20 - 30 min im Dunkeln das in der Substratlösung enthaltene ortho-Phenyldiamin (OPD) und führt so zur Bildung eines Farbstoffs. Nach Abstoppen der Reaktion mit H_2SO_4 wurde die Farbintensität photometrisch bei 405 nm (570 nm Referenzfilter) am ELISA-Lesegerät gemessen und die Zytokinkonzentration über eine Standardkurve berechnet. Bei der Auswertung wurde die anfängliche Verdünnung der Proben berücksichtigt.

2.2.8 Proteinbiochemie

2.2.8.1 Western Blot

2.2.8.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels Polyacrylamidgelen können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu werden Acrylamid und Bisacrylamid unter dem Einfluss von Ammoniumpersulfat und TEMED zwischen zwei Glasplatten polymerisiert und quervernetzt. Zwischen zwei vertikalen Glasplatten wurde dazu zuerst das 6 % SDS-PAGE Trenngel gegossen und mit Isobutanol zur Bildung einer glatten Gelgrenze überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Isobutanol wieder abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Mit einem Probenkamm wurden im Sammelgel Aussparungen für die Proteinproben erzeugt. Die Elektrophorese-Kammer wurde nun zusammengebaut und mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die Proteinlösungen wurden aufgetaut, noch einmal aufgeköcht ($95^\circ C$, 5 min) oder direkt nach Probenaufbereitung (s. 3.2.1.7) in einer Konzentration von jeweils 20 μg Protein pro Geltasche vorsichtig in die Aussparungen pipettiert. Parallel wurde in eine Tasche ein Proteingrößenstandard aufgetragen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese, zuerst für ca. 25 min bei 75 Volt, um die Proteine durch das Sammelgel wandern zu lassen, und dann für ca. 50 min bei einer Spannung von 170 Volt, um die Proteine anhand ihrer Größe im Trenngel aufzutrennen.

2.2.8.1.2 Western Blotting

Nach dem Elektrophoreselauf wurden die aufgetrennten Proteine mittels Semi Dry Blotting vom Gel auf eine hydrophobe Polyvinylidifluorid (PVDF) Membran, (Hybond-P-Trägermembran, Amersham, Little Chalfont, GB) übertragen. Dazu wurden vier mit Western-Blot-Puffer getränkte Whatman-Filter auf die Transferkammer (Biorad, München) gelegt. Das aus den Glasplatten heraus gelöste Gel wurde in Puffer äquilibriert und blasenfrei auf die Filter gelegt, gefolgt von der Hybond-P-Membran, die zuvor für 5 min in Methanol eingeweicht und für 5 min in Western-Blot-Puffer äquilibriert wurde. Darauf wurden wiederum vier mit Puffer getränkte Filter gelegt und die Transferkammer geschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte bei 90 mA für eine Stunde mittels Semi Dry Blotting. Dabei werden die Proteine in gleicher Anordnung wie auf dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Die Membran mit den darin fixierten Proteinen wurde sofort weiterverarbeitet oder in Konservierlösung bei 4° C aufbewahrt.

2.2.8.1.3 Detektion durch spezifische Antikörper

Die PVDF-Membran wurde mehrfach in TBST gespült, unspezifische Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation in Blockpuffer (5 % Magermilch in TBST) abgedeckt und die Membran erneut dreimal in TBST gewaschen. Anschließend wurde der spezifische Primärantikörper gegen das zu detektierende Protein in TBST/ 5% BSA/ 0,1% NaN₃ 1:1000 verdünnt und zusammen mit der Membran in Folie eingeschweißt über Nacht bei 4°C auf einem Taumelroller inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran wurde zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers der passende Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (1:3000 in Blockpuffer verdünnt) zugegeben. Nach Inkubation von 1 h auf dem Schüttler folgten weitere Waschschrte und die Überschichtung der Membran mit ECL-Reagenz für die Detektion des jeweils nachzuweisenden Proteins. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mittels einer Peroxidase-katalysierten Lumineszenzreaktion, wobei das entstehende Licht in der Dunkelkammer über Filmpapiere aufgefangen wurde. Die entwickelten Filme zeigen schwarze Banden mit steigender Intensität, je mehr Protein auf der Membran vorhanden war.

2.2.8.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen durch zweidimensionale Gelelektrophorese (Isoelektrische Fokussierung (IEF)/SDS-PAGE) wurde mit Hilfe des PROTEAN IEF CellSystems von BioRad durchgeführt. Hierbei werden die Proteine in der 1. Dimension (s. 2.2.8.2.1) nach

ihrem isoelektrischen Punkt und in der 2. Dimension (s. 2.2.8.2.3) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Diese Methode gehörte nicht zu den Labor-Standardmethoden und musste neu etabliert werden.

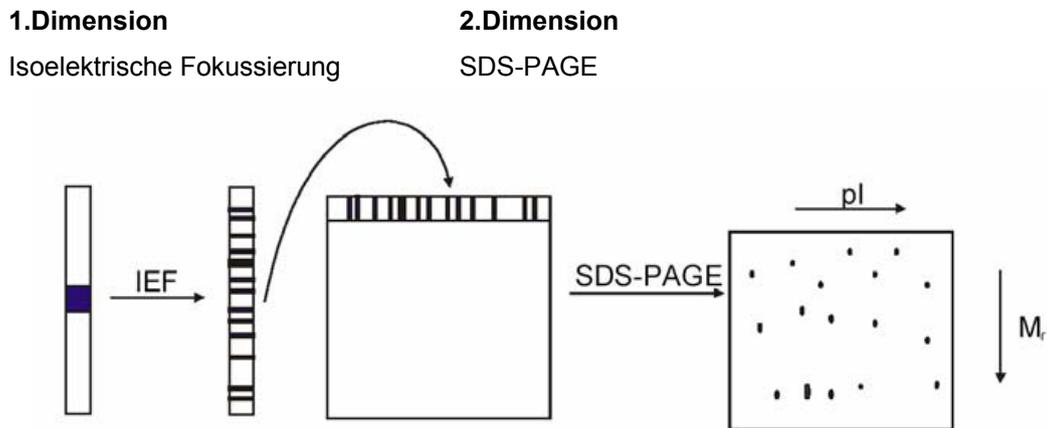


Abb.2.2.8.2: Prinzip der 2D-Gelelektrophorese (Quelle: T. Burmester & T. Hankeln, Johannes Gutenberg Universität Mainz (<http://molgen.biologie.uni-mainz.de/Downloads/PDFs/Genomforsch/Protein2-2005.pdf>))

2.2.8.2.1 1. Dimension

In der 1. Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt durch Fokussierung entlang eines immobilisierten pH-Gradienten (IEF-Gelstreifen, Biorad) aufgetrennt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die T-Zelllysatzmenge entnommen, die 110 μg Protein entsprach und mit 300 μl Thiourea-Laufpuffer gemischt. Anschließend wurden diese Proben jeweils in der Vertiefung eines Fokussierungsschlittens verteilt. Darauf wurden je ein ReadyStrip™ IPG Streifen mit einem linearisierten, immobilisierten pH Gradienten von pH 4 bis pH 7 (17 cm) aufgelegt und mit 1500 μl Mineralöl überschichtet. Nach dem Lauf (s. 3.2.8.2.2) wurden die Streifen entweder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt für die 2. Dimension (SDS-PAGE) äquilibriert. Dazu wurden die Streifen für 30 min. in 1 ml Äquilibrierungspuffer (6 M Harnstoff; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 2% SDS; 20% Glycerin) mit 1% DTT und anschließend weitere 30 min. in 1 ml Äquilibrierungspuffer mit 4% Iodoacetamid inkubiert. Danach wurden die Streifen auf die 2. Dimension aufgebracht (12%iges 1 mm dickes Gel (s. 3.2.8.2.3), Diskontinuierliche Gelelektrophorese), ProteanXL 1 mm (BioRad, mit einer Markertasche) und mit handwarmer 1%iger „Low melting Agarose“ fixiert. Der Lauf erfolgte bei konstanten 50 V für 1000 Vh über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Gele fixiert

(Methanol: Essigsäure: Wasser – 40 : 10 : 50) und mit SybroRuby (s.3.2.9.2) bzw. Silber gefärbt (s. 3.2.9.1).

2.2.8.2.2 Laufbedingungen der 1. Dimension

Programm: Aktive Rehydrierung : 50 V

Auftrennung : Spannung linear steigend 1 min bis 200 V

200 V, 2 h halten

Spannung linear steigend 1 min bis 500 V

500 V, 2 h halten

Spannung linear steigend bis 2000 V

2000 V, 1 h halten

Spannung linear steigend 3 h bis 8000 V

8000 V, für 100 000 V h

Spannung schnell abfallend auf 1000 V

Die Gesamtlaufzeit beträgt für dieses Programm 125 kWh. Der Lauf wurde über Nacht gestartet. Alle Laufschnitte wurden bei 20°C durchgeführt. Am Ende wurden solange die 1000 V gehalten bis das Gerät ausgeschaltet und die Streifen entnommen wurden. Somit wurden die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt gehalten.

2.2.8.2.3 2. Dimension - Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteingemische der 1. Dimension nach ihrem Molekulargewicht wurde eine reduzierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurden Glasplatten (ProteanXLSystem von BioRad) nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt und ein 1 mm Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol mit Milliporewasser abgespült und mit Hilfe eines Filterpapiers trockengesaugt. Anschließend wurden die Streifen der 1. Dimension auf die 2. Dimension aufgebracht. Die fertigen Gele wurden in die Gel-Apparaturen eingespannt und mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Der Lauf erfolgte bei 50 Volt für 1000 Vh über Nacht mit Wasserkühlung.

2.2.9 Färben von Gelen

2.2.9.1 Silberfärbung

Als sehr sensitive Methode zur Darstellung und weiteren Analyse von Proteinspots wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die Gele nach dem Lauf für 45 min fixiert (Methanol: Essigsäure: Wasser – 40 : 10 : 50). Anschließend wurde die Säure durch 3-maliges Waschen mit Milliporewasser entfernt und das Gel mit 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat für eine Minute sensibilisiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Milliporewasser wurde 30 min mit 0,1% (w/v) Silbernitrat bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene Silbernitrat mit Milliporewasser entfernt und das Gel mit Entwickler (0,04% (v/v) Formaldehyd, 2% (w/v) Natriumkarbonat) inkubiert, bis die erwünschte Färbung eingetreten war. Die Reaktion wurde mit 1%iger (v/v) Essigsäure gestoppt und das Gel anschließend in 1%iger (v/v) Essigsäure bei 4°C gelagert.

2.2.9.2 Fluoreszenz-Färbung mit SYPRO®Ruby

Um die gewünschten Proteine auf den 2-D-Gelen präparativ identifizieren zu lassen, wurde die SYPRO®Ruby Fluoreszenz-Färbung angewendet. Diese Färbung beruht auf der Anbindung des Fluoreszenz-Farbstoffes an basische Aminosäuren. Das Gel wurde dabei zuerst für 45 min fixiert (Methanol: Essigsäure: Wasser – 40 : 10 : 50) und anschließend für mindestens 3 h oder über Nacht in der SYPRO®Ruby Lösung gefärbt. Hierbei wurde das 10-fache Gelvolumen an SYPRO®Ruby Lösung eingesetzt, die Färbung fand in einer Plastikschaale statt. Zur Reduzierung des Hintergrundes wurde erneut für 30 min in 10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure gewaschen, bevor das Gel anschließend in einem Fluoreszenzscanner eingescannt wurde.

2.2.9.3 Colloidal Coomassie-Färbung

Zum Anfärben von Gelen, aus denen Spots mittels Massenspektrometrie analysiert werden sollten, wurde ebenfalls eine modifizierte Coomassie-Färbung verwendet. Zum Färben mit Colloidal Coomassie wurden die Gele über Nacht unter Schütteln in eine Färbelösung (0,08% Coomassie Brilliant Blue G250, 1,6% Orthophosphorsäure, 8% Ammoniumsulfat, 20% Methanol) gegeben. Anschließend wurden sie mit Milliporewasser durch mehrfaches Waschen entfärbt, bis der Hintergrund klar wurde. Die gefärbten Gele

wurden dann mit etwas Milliporewasser/ 1% Natriumazid in Folie eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.2.10 Protein-Sequenzierung und Massenspektrometrie

Proteinmikrosequenzierung und Massenspektrometrie wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Franz am EMBL (European Molecular Biology Laboratory) in Heidelberg durchgeführt. Es wurden fünf Proteinspots ausgewählt, welche bei Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3 / -CD28 (s. 3.2.2.2) in Argininabwesenheit im Gegensatz zu unstimulierten und in Anwesenheit von Arginin stimulierten Zellen stärker exprimiert wurden. Die Proteinspots wurden aus einem präparativen SyproRuby gefärbten 2D-Gel mittels eines „Spot-Picker-Roboters“ (EXQuest Spot Cutter, Biorad) ausgestochen und anschließend wurden die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut. Die Identifizierung der Proteine erfolgte über die massenspektrometrische Methode MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation' (MALDI) 'time-of-flight' (TOF); MALDI MICRO MX™, Waters) (Shevchenko et al. 2000). Die Analyse erfolgte im Mass Peptide Fingerprint Verfahren. Hierbei werden die Massen der entstandenen Peptide mit den Massen eines theoretischen Verdauts in der SWISS-PROT-Datenbank verglichen.

2.2.11 Messung der immunologischen Synapse

Um die Ausbildung der immunologischen Synapse bei T-Zellaktivierung über antigenpräsentierende Zellen zu untersuchen, wurden Raji Lymphom B-Zellen und T-Lymphozyten aus peripherem Blut verwendet. Die Analyse erfolgte mittels ImageStream® (Amnis, Seattle, USA), einem FACS-Gerät mit integriertem Fluoreszenz-Mikroskop. Ansätze und Analysen wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe Prof. Dr. Y. Samstag/Institut für Immunologie der Universität Heidelberg, durchgeführt. Hierzu wurden zunächst T-Zellen bei 37°C/ 5% CO₂ über Nacht in argininfreiem bzw. argininhaltigem Medium präinkubiert und am nächsten Tag, wie in *Hosseini et al* (Hosseini et al. 2009) und *Klemke et al* (Klemke et al. 2008) beschrieben, mit Superantigen beladenen Raji B-Zellen inkubiert und die Kolokalisation von zellmembranständigen Proteinen (CD3, CD2) mittels ImageStream® gemessen.

2.2.12 Migrationsassay

Zur Bestimmung der argininabhängigen Migrationsfähigkeit humaner T-Lymphozyten wurden 1×10^6 primäre T-Lymphozyten zunächst in je 3 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und in einer 24 Loch-Flachbodenplatte über Nacht bei 37°C / 5% CO_2 präinkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 96 Loch-Transwellplatten (Corning, Niederlande) ausgesät. Das untere Kompartiment der Transwellplatte wurde mit je 200 μl argininfreiem bzw. argininhaltigen Medium mit oder ohne Zusatz des Chemokins SDF-1 α (100ng/ ml) befüllt. Der Ansatz ohne Zugabe von SDF-1 α diente zur Bestimmung der Spontanmigration der T-Zellen. In die oberen Kompartimente wurde jeweils 75 μl der Zellsuspension (entspricht 5×10^4 Zellen) gegeben. Die Migrationseffizienz wurde bezogen auf den 100% Wert, für den in das untere Kompartiment je 5×10^4 Zellen und Medium hinzugegeben wurden. Sämtliche Bestimmungen erfolgten jeweils in Triplikaten. Nach 4 – 5 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurde das obere Kompartiment vorsichtig abgenommen und je 150 μl aus dem unteren Kompartiment in ein FACS-Röhrchen überführt. Direkt vor der Messung wurden auf jedes Röhrchen gleichmäßig mit dem Multistepper je 50 μl FACS-Puffer der zuvor mit 1-2 Tropfen unmarkierter Plastik Kügelchen versehen wurde, verteilt. Nun wurde anhand einer bestimmten Anzahl an eingelesenen Plastik Kügelchen (z.B. 25000) die Anzahl der gewanderten Zellen gemessen. Über das Verhältnis gemessene Kügelchen / Zellen wurde anhand des 100%-Wertes der prozentuale Anteil an gewanderten Zellen ermittelt und verglichen. Eine statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad über student's t-Test (Mean +/- SD).

2.2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, USA). Zum Vergleich von zwei Parametern wurde der gepaarte Student's t-test mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ verwendet. Es wurden die Kombinationen T-Zellen in argininhaltigem oder argininfreiem Medium mit anti-CD3/ -CD28-gekoppelten Partikel und T-Zellen in argininfreiem oder argininhaltigen Medium mit Superantigen beladenen B-Zellen stimuliert verglichen und auf Signifikanz geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Hemmung der T-Zellproliferation bei Arginindefizienz

In den letzten Jahren stellte sich durch zahlreiche Publikationen heraus, dass die Arginin-Depletion ein zentraler physiologischer Mechanismus der inflammations-assoziierten Immunsuppression ist. Erstmals wurde von der Gruppe um Ochoa die spezifische Bedeutung der Aminosäure Arginin für die Stimulierbarkeit humaner T-Zellen untersucht und beschrieben, dass die Abwesenheit von Arginin zu einem Verlust der Expression der TCR- ζ -Kette (Rodriguez et al. 2002) sowie einem Arrest der Zellen in der G0-G1 Phase des Zellzyklus führt (Rodriguez et al. 2007). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass humane Granulozyten die konstitutiv exprimierte Arginase I freisetzen können und die konsekutive extrazelluläre Arginindepletion u.a. zu einer völligen Hemmung der Proliferation stimulierter humaner T-Zellen führt. Bei pharmakologischer Hemmung der Arginase und Arginin-Supplementation wird diese T-Zell-Inhibition bei granulozytär dominierter Inflammation verhindert (Munder et al. 2006). Zunächst wurden daher die früher publizierten Daten zur Inhibition der T-Zell-Proliferation bei Arginindepletion aktuell verifiziert. Hierzu wurden humane primäre T-Lymphozyten in An- oder Abwesenheit von Arginin stimuliert und die Proliferation mittels [^3H]-Thymidinassays analysiert (s. Kap. 2.2.6.1). In Abb. 3.1 ist eine repräsentative [^3H]-Thymidin-Messung gezeigt, welche beispielhaft die früheren Daten (Munder et al. 2006) bestätigt. Man kann deutlich an der inkorporierten Radioaktivität (als Ausdruck der DNA-Synthese) erkennen, dass die aktivierten T-Zellen in Argininanwesenheit proliferieren (37480 ± 8896 Counts/Minute (cpm)), wohingegen sich die Zellen bei Abwesenheit von Arginin (82 ± 19 cpm) nicht teilen. Als Kontrollen wurden unstimulierte T-Zellen gemessen.

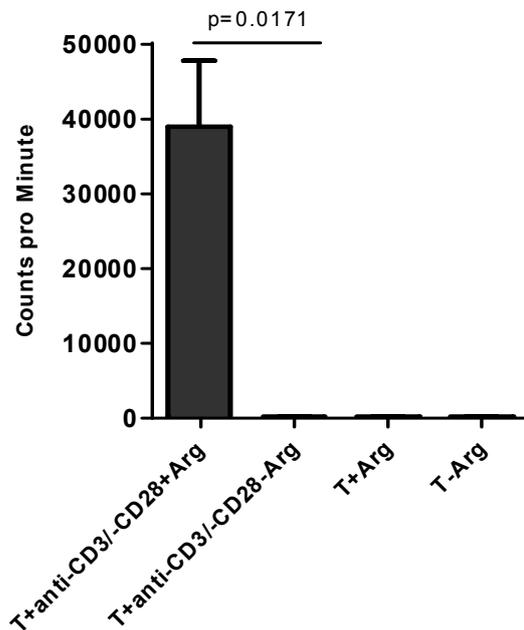


Abb.3.1: Proliferationsmessung humaner T-Zellen mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay. Statistische Auswertung mittels gepaartem Student's t-Test (Mittelwert \pm SD) eines repräsentativen $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assays. T-Zellen wurden mit anti-CD3/-CD28 stimuliert (schwarze Balken), unstimulierte Zellen als Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt 42 separaten Experimenten.

3.2 Etablierung der 2D-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Frage, welche intrazellulären Mechanismen für die durch Arginindefizienz vermittelte Suppression der T-Zellimmunantwort verantwortlich sind, wurde die Methode der 2D-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.8.2) angewandt. Dabei werden Proteingemische zunächst nach der isoelektrischen Ladung der einzelnen Proteine und anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Färbung der Gele können hierbei Unterschiede im Proteinexpressionsmuster verschiedener Proben sichtbar gemacht werden. Diese Methode musste jedoch in meiner Arbeitsgruppe zunächst etabliert werden. Im Folgenden wird die Etablierung anhand eines für T-Zellen vorgesehenen Protokolls, das von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Y. Samstag / Institut für Immunologie der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde, beschrieben. Zunächst wurden mit dem TKM-Lysepuffer T-Zelllysate aus je 1×10^6 Jurkat T-Zellen hergestellt. Anschließend wurden TKM-T-Zelllysate aus 1×10^6 humanen T-Lymphozyten verwendet. Für die isoelektrische Fokussierung wurde zur Übersicht der pH-Bereich 3 – 10 gewählt. Die nach SDS-PAGE entstandenen Gele wurden dann silbergefärbt (Abb.3.2).

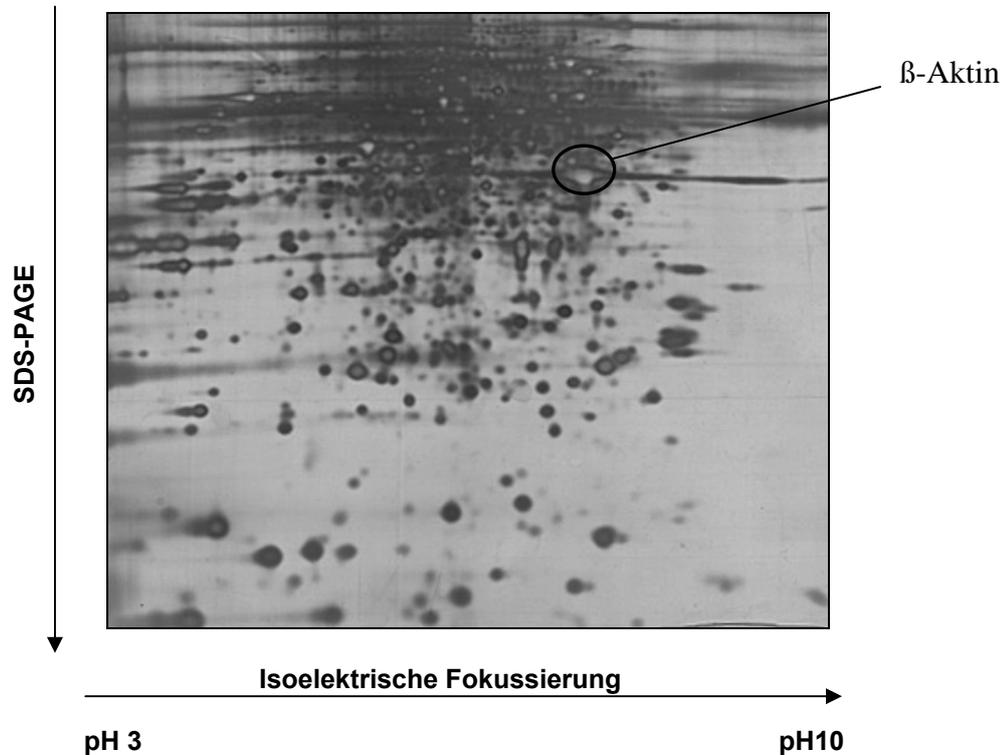
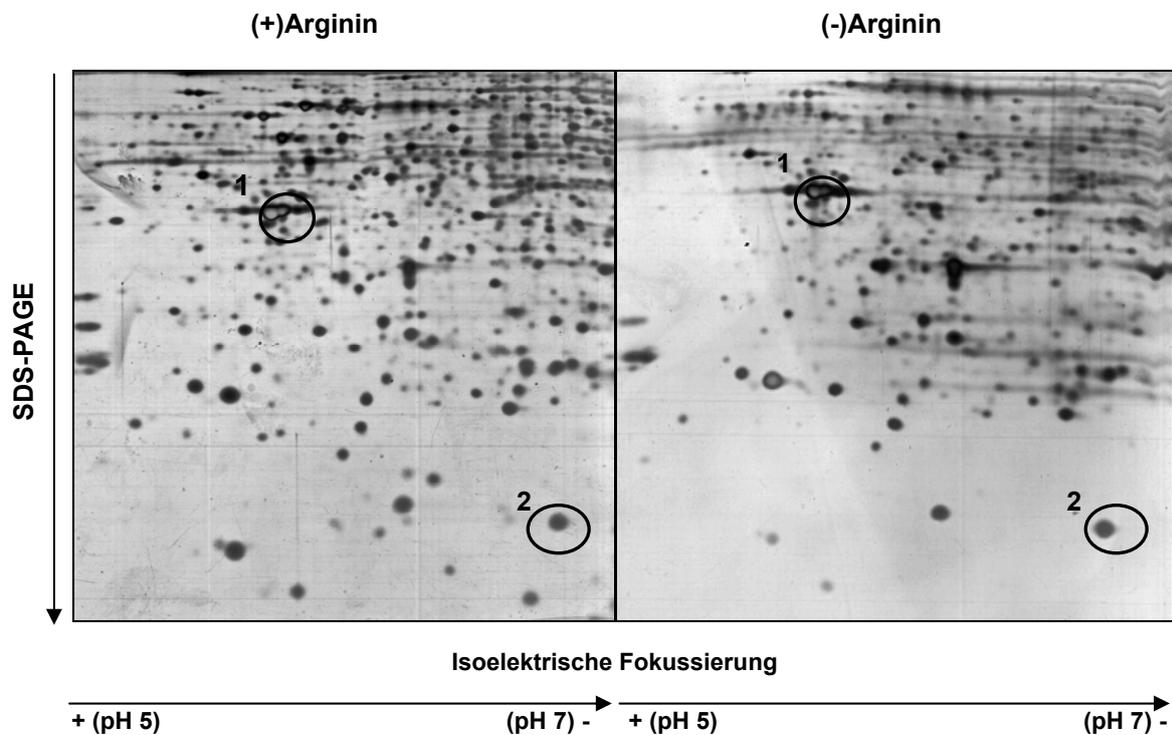


Abb.3.2.1: Silbergefärbtes 2D-Gel des pH-Bereichs pH 3 – pH 10 eines TKM-T-Zelllysats. Humane T-Zellen wurden für 48 h in argininhaltigem Medium mit anti-CD3/-CD28 stimuliert und dann mit TKM-Lysepuffer lysiert. Zur Übersicht wurde eine 2D-Gelelektrophorese im pH-Bereich von pH 3 – pH 10 durchgeführt. Die einzelnen dunklen Punkte (Spots) auf dem Gel zeigen je ein oder mehrere Proteine an. Der mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnete Spot entspricht dem Protein β -Aktin, welches in allen untersuchten Zellen vorhanden ist und als Orientierung bei der Auswertung diente. Für das Gel wurde eine Gesamtproteinmenge von 20 μ g aufgetragen.

Nach Erreichen einer zufriedenstellenden Reproduzierbarkeit wurden TKM-Lysate aus humanen T-Zellen, die zuvor für 48 h in argininhaltigem oder argininfreiem Medium mit anti-CD3/-CD28 stimuliert wurden, entsprechend analysiert. Als Kontrolle wurden Lysate von unstimulierten T-Zellen ($t= 0$ h) analysiert. Pro Gel wurde jeweils die gleiche Menge von 20 μ g Gesamtprotein eingesetzt, was die reproduzierbare Detektion einer Vielzahl von ausreichend zur Darstellung kommenden Proteinspots erlaubte. Ein breiter pH-Bereich von pH 3 -10 erwies sich jedoch für eine Analyse individueller Proteinspots als zu komplex, so dass zahlreiche Proteinspots zu nahe bzw. partiell oder komplett überlappend zur Darstellung kamen. Es wurden daher engere pH Bereiche von pH 4 – 7 und pH 5 – 8 gewählt. Ferner wurden die Laufzeiten für das SDS-PAGE Gel verlängert, um eine noch bessere Auftrennung der immer noch zahlreichen Spots zu erreichen. Parallel hierzu

wurden Gele im pH Bereich von 7- 10 produziert, die nicht auswertbar waren, da es eine zu starke Streifenbildung gab, welche unter anderem durch eine zu hohe Salzkonzentration entstehen kann. Laut Angaben des Herstellers ist dies durch „Cuploading“, eine Variante der isoelektrischen Fokussierung, bei der mobile Elektroden verwendet und die Probe entweder am kathodischen oder anodischen Ende in ein Plastikcup hineingegeben werden, reduzierbar. Zusätzlich können die Streifen mit einem sogenannten DestreakReagenz vermindert werden. Dies führte jedoch nicht zum Erfolg. Letztendlich konnten im Bereich von pH 4 - 7 reproduzierbare Gele hergestellt und partiell sogar visuell ohne Hilfe eines automatisierten Auswertesystems auf Unterschiede analysiert werden. Aufgrund mangelnder Quantifizierung der Silbergele, auf denen die Spotstärke nicht immer gleich der Proteinexpression ist, können hierbei nur in manchen Fällen Unterschiede erkannt werden und die Gele sind nur z.T. mit den zur Analyse verwendeten SYPRO®Ruby gefärbten Gele zu vergleichen. Für den in Abb. 3.2.2 gezeigten Spot Nr.2 war es mit dieser Färbetechnik daher z.B. kaum möglich einen Unterschied zu erkennen.



2D-SDS-PAGE – (Silberfärbung)

Abb.3.2.2: Ausschnitt silbergefärbter Gele im pH-Bereich pH 5 – pH 7. Primäre humane T-Zellen wurden 48 h mit anti CD3/-CD28 in argininfreiem [(-)Arginin] oder argininhaltigem [(+)Arginin] Medium stimuliert. Die T-Zelllysate wurden dann mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der gekennzeichnete (schwarzer Kreis) Spot 2 wurde später als phospho-Cofilin identifiziert (s. Tab. 3.3 und Abb. 3.3A). Der Spot Nr. 1 (β -Aktin) dient zur Orientierung auf dem jeweiligen Gel. Diese Gele konnten in fünf unabhängigen Experimenten mit T-Zellen verschiedener Blutspender reproduziert werden.

Nachdem die Reproduzierbarkeit der Gele gewährleistet war, wurden die interessanten Proteinspots mittels massenspektrometrischer Methoden identifiziert. Nach Testung verschiedener Färbeverfahren (Silberfärbung, Colloidal Coomassie) wurde schließlich für die präparative Analyse die sensitive, SYPRO[®]Ruby Fluoreszenzfärbung verwendet. Für diese Färbung musste die Proteinmenge für ein präparatives Gel auf 100 μ g erhöht werden. Parallel wurde auch das Laufprogramm für die Fokussierung verändert um die Auftrennung weiter zu optimieren und streifenfreie Gele zu bekommen. Es wurde dann aus präparativen SYPRO[®]Ruby gefärbten Gelen eine massenspektrometrische Identifizierung von fünf Proteinspots durchgeführt, die bei Argininabwesenheit reproduzierbar stärker ausgeprägt waren (Tab. 3.3 und Abb. 3.3). Die Auswertung der Gele erfolgte per Auge und der Software Proteomweaver von BioRad.

3.3 Identifizierung veränderter Proteinexpressionen in stimulierten T-Zellen bei Arginindefizienz

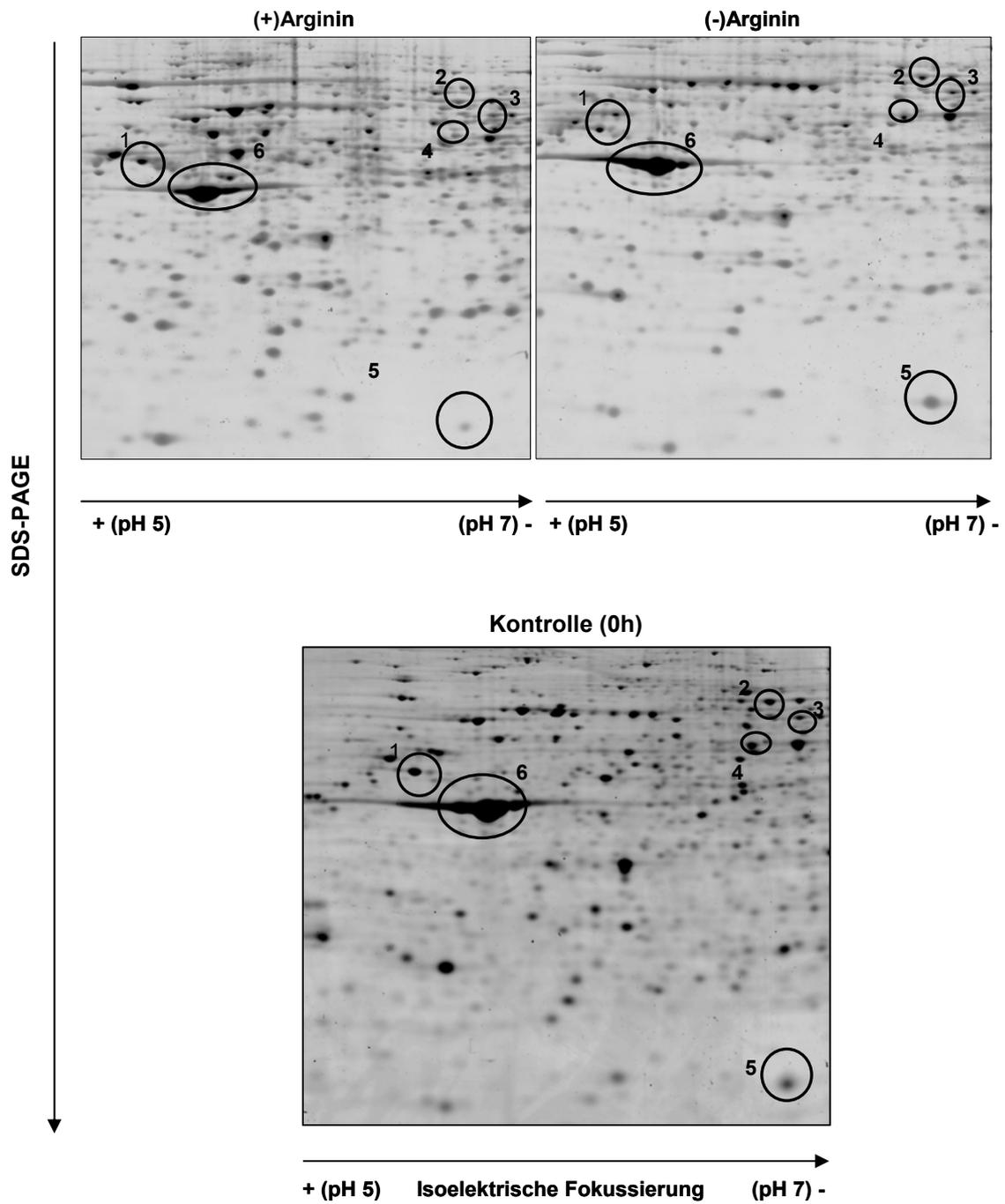
Nach Etablierung der 2D-Gelelektrophorese wurden primäre humane T-Zellen für 48 h in argininfreiem oder argininhaltigen Medium mit anti-CD3/-CD28 stimuliert. Aus den T-Zelllysaten wurden SYPRO[®]Ruby gefärbte 2D-Gele hergestellt. Insgesamt konnten in einem Gel bei Stimulation von T-Zellen fünf Proteinspots, die bei Argininmangel stärker exprimiert waren und zuvor auch reproduzierbar in den silbergefärbten Gelen zu detektieren waren, identifiziert und mittels Massenspektrometrie sequenziert werden. Aus den fünf Proteinspots liessen sich sieben verschiedene Proteine identifizieren (s.Tab. 3.3).

Spot	Protein
1	Alpha-Tubulin, Vimentin
2	Moesin
3	WD Repeat Protein 1
4	Coronin-1A, GLSK (Glutaminase Kidney Isoform)
5	phospho-Cofilin-1

Tab.3.3: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine mit Überexpression bei Argininabwesenheit

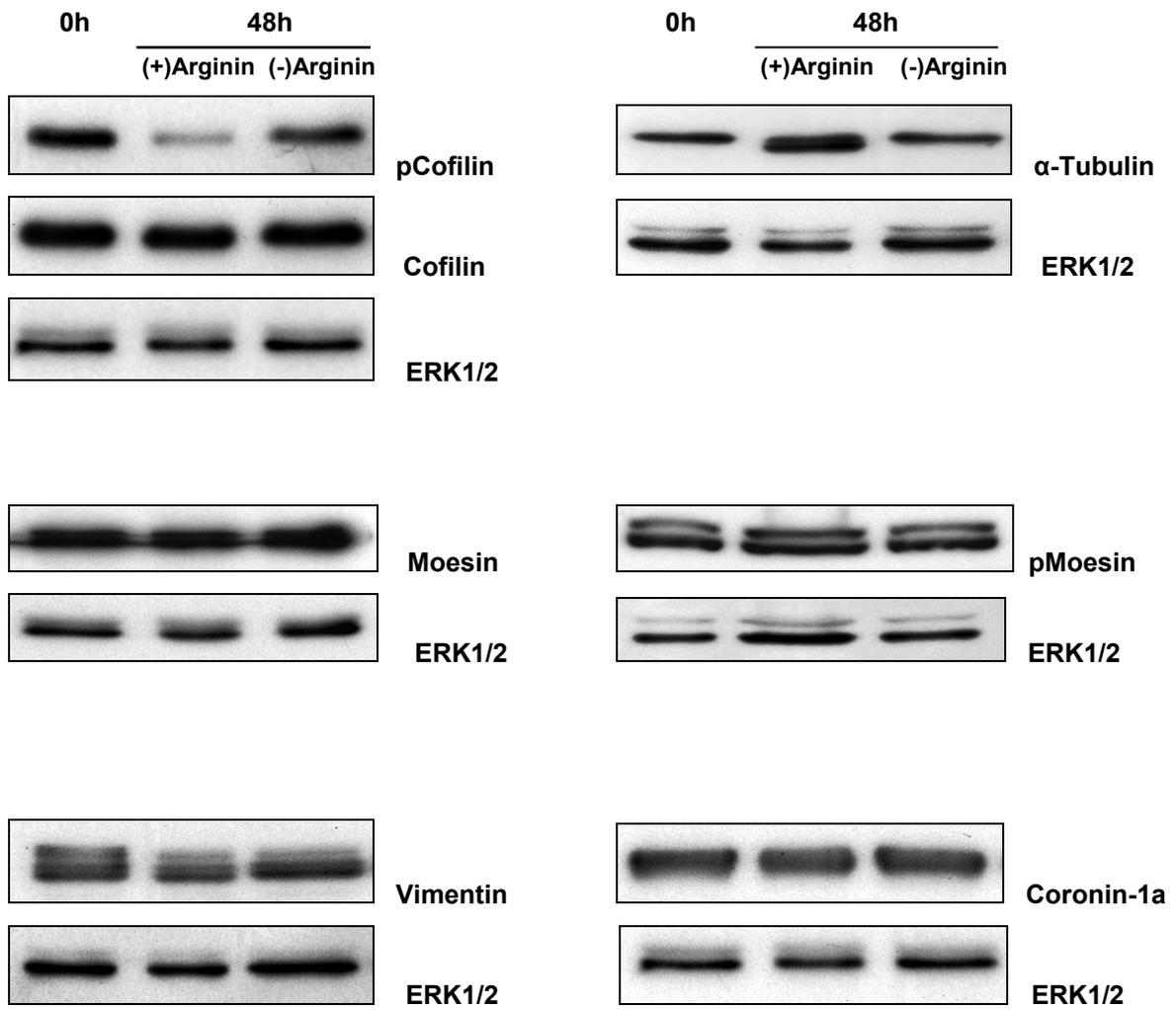
Interessanterweise steht der Großteil dieser Proteine in Zusammenhang mit dem Zytoskelett der T-Zellen. Die Unterschiede in der Proteinexpression wurden im folgenden mittels Westernblotanalyse unter Verwendung spezifischer Antikörper überprüft (Kap. 2.2.8.1). Hierbei stellte sich heraus, dass nur eines der Proteine, die inaktive phosphorylierte Form des Cofilin-1, bei Argininabwesenheit stärker exprimiert wird. Die Phosphorylierung von Cofilin im Bezug auf unstimulierte T-Zellen (100% Dephosphorylierung) ist bei Argininmangel nur um $25,5 \pm 18,8\%$ reduziert, wohingegen die Phosphorylierung bei Argininanwesenheit um $67,5 \pm 20,1\%$ reduziert ist (Vergleich der Dephosphorylierung bei An- und Abwesenheit von Arginin: $p=0.0029$; $n=7$ unabhängige Experimente) (Abb.3.3C). Im Gegensatz dazu, konnte bei α -Tubulin eine verstärkte Expression bei Argininanwesenheit gezeigt werden. Alle weiteren Proteine zeigten keine Unterschiede in der Proteinexpression (Abb. 3.3B.) in Abhängigkeit von Arginin. Die SYPRO[®]Ruby gefärbten Gele in Abb. 3.3 zeigen das Proteinmuster von stimulierten T-Zell-Lysaten bei Argininanwesenheit, Argininmangel und von T-Zell-Lysaten unstimulierter Zellen im Vergleich. Die Proteinspots, aus denen die identifizierten Proteine sequenziert wurden, sind mit schwarzen Kreisen gekennzeichnet.

A.



2D-SDS-PAGE – (SYBRO® Ruby-Färbung)

B.



C.

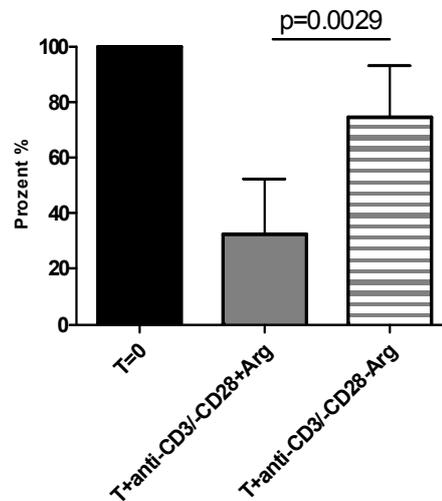


Abb.3.3: 2D-Gelelektrophorese zur Analyse der bei Argininabwesenheit stärker exprimierten Proteine und Bestätigung mittels Westernblot. Primäre humane T-Zellen wurden in argininhaltigem [(+)Arginin] oder argininfreiem [(-)Arginin] Medium mittels anti-CD3/-CD28 stimuliert. Als Kontrolle (0h) wurden unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt t=0 h lysiert. **A.** Gezeigt werden Ausschnitte von drei repräsentativen SYPRO®Ruby gefärbten Gelen im pH-Bereich 4-7, je Bedingung ein Gel. Die identifizierten Proteinspots sind mit schwarzen Kreisen und einer Nummer entsprechend der Tabelle gekennzeichnet. Aus dem Proteinspot Nr. 1 konnten die Proteine alpha-Tubulin und Vimentin identifiziert werden. Proteinspot Nr. 2 entspricht Moesin, Proteinspot Nr. 3 dem WD repeat Protein 1, Proteinspot Nr. 4 den Proteinen Coronin-1 und GLSK und aus Proteinspot Nr.5 konnte pCofilin sequenziert werden. Zur Orientierung dient Spot Nr. 6, das β -Aktin. Es wurden je drei unabhängige Experimente durchgeführt. **B.** Westernblots je eines repräsentativen Experiments der in der 2D-Gelanalyse identifizierten Proteine und – falls bekannt - ihrer phosphorylierten Formen: Cofilin, pCofilin, α -Tubulin, Moesin, pMoesin, Vimetin und Coronin-1a mit ERK1/2-Expression als Ladekontrolle. Es wurden Westernblots von mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. **C.** Grafische Darstellung des Mittelwerts \pm Standardabweichung der Westernblotdaten von pCofilin von insgesamt sieben unabhängigen Experimenten.

3.4 Vergleich der T-Zellproliferation bei Stimulation mit anti-CD3 / -CD28 und SEB-beladenen Raji B-Zellen

In den proteomischen Analysen und den folgenden Western Blot Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass bei T-Zell-Aktivierung die Dephosphorylierung des Proteins Cofilin-1 bei Argininmangel ausbleibt. Der Phosphorylierungsstatus des Proteins Cofilin ist im Rahmen der T-Zell-Aktivierung wesentlich an der Verknüpfung von T-Zell-Rezeptor-Aktivierung mit der folgenden Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. In Vorbereitung der unten dargestellten funktionellen Analysen (insbesondere zur Organisation der Immunologischen Synapse) musste daher zunächst ein System der T-Zell-Aktivierung durch APZ etabliert

werden. Insbesondere war die Frage zu klären, ob die profunde Suppression der T-Zellfunktionen (die bis dato im Rahmen der artifiziiellen Stimulation durch Antikörper analysiert worden war) auch im zellulären APZ-Kontext feststellbar war.

Als antigenpräsentierendes System wurden Raji B-Zellen, die mit dem Superantigen SEB beladen wurden, verwendet. Die Proliferationsrate primärer humaner T-Zellen in An- oder Abwesenheit von Arginin wurde bei Stimulation durch beide verschiedenen Methoden zunächst verglichen. Bei Verwendung der immortalisierten teilungsaktiven B-Zell-Linie wurde statt der [³H]-Thymidin-Messung die Analyse der zellulären T-Zell-Proliferation mittels CFSE-Färbung verwendet. Die Teilung der T-Zellen wurde über CFSE-Weitergabe mit dem Durchflusszytometer gemessen (Kap. 2.2.6.2). Bei beiden Stimulationsarten wurden T-Zellen, die in argininhaltigem Medium inkubiert wurden, gleichermaßen zur Proliferation angeregt. In argininfreiem Medium konnte jeweils keine Proliferation nachgewiesen werden. Insgesamt war die Proliferationsrate bei superantigener APZ-basierter Stimulation im Vergleich zur Stimulation mit anti-CD3/-CD28 geringer (Abb.3.4).

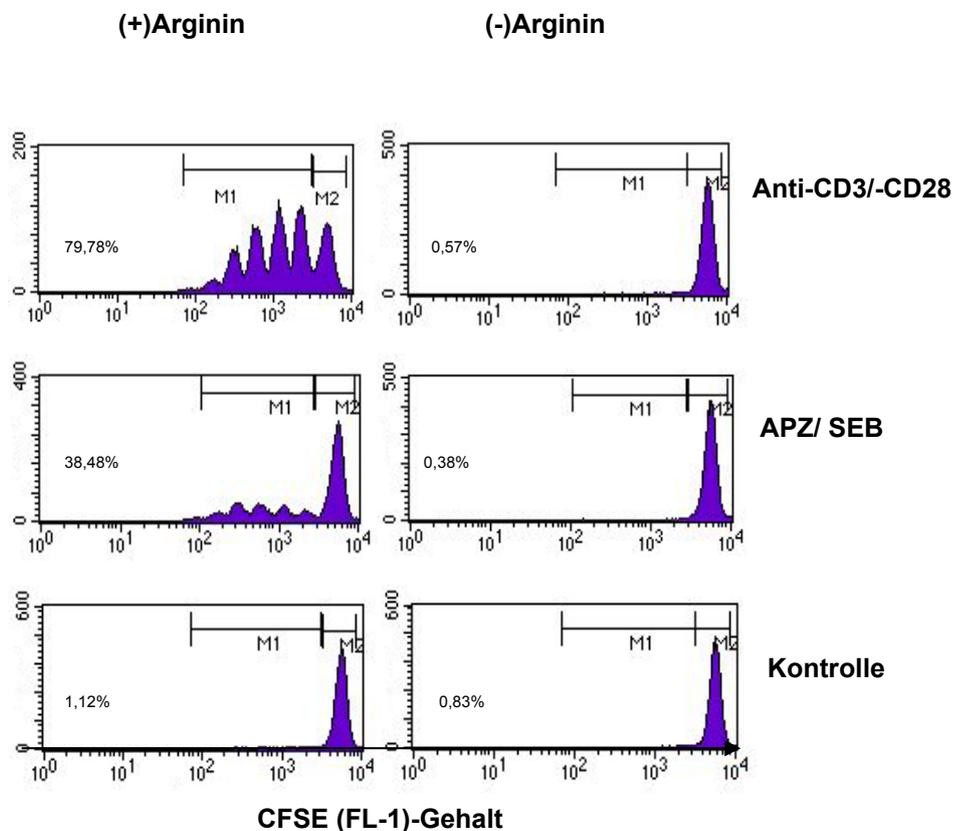


Abb.3.4: Bestimmung der Proliferationsrate humaner T-Zellen mittels FACS-Analyse. Humane T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für 96 h mit anti-CD3/ -CD28 oder antigenpräsentierenden SEB-beladenen Raji B-Zellen (APZ/ SEB) in (-)Arginin- oder (+)Argininmedium stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte T-Zellen in den Medien inkubiert. Gezeigt ist der CFSE-Gehalt und die Proliferationsrate in Prozent anhand von Histogrammen. Die Abnahme des CFSE-Gehaltes, d.h. die kleiner werdenden Peaks nach links, zeigt eine Teilung der Zellen an. M1 zeigt den Anteil der proliferierten Zellen. Die Prozentangaben beziehen sich auf M1.

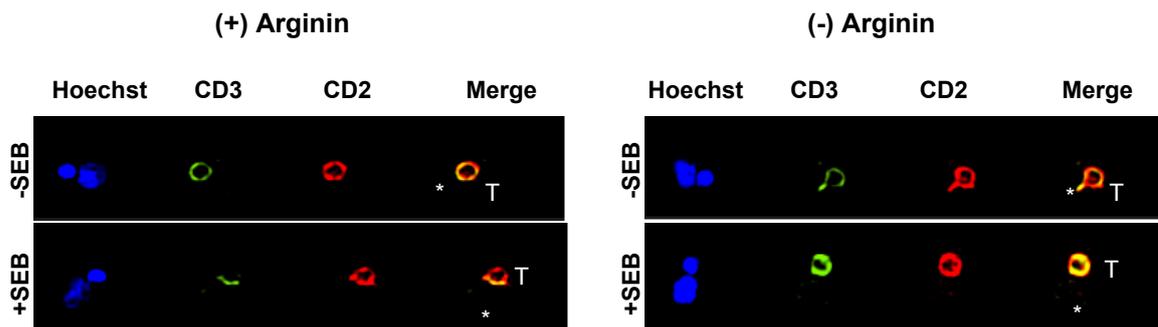
Zusammenfassend ist der Proliferationsdefekt humaner T-Lymphozyten bei Abwesenheit von Arginin auch im Zell-Zell-Kontext der Stimulation durch APZ feststellbar, so dass dieses System für die weiteren Analysen zum Aufbau der immunologischen Synapse validiert zur Verfügung stand.

3.5 Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und APZ

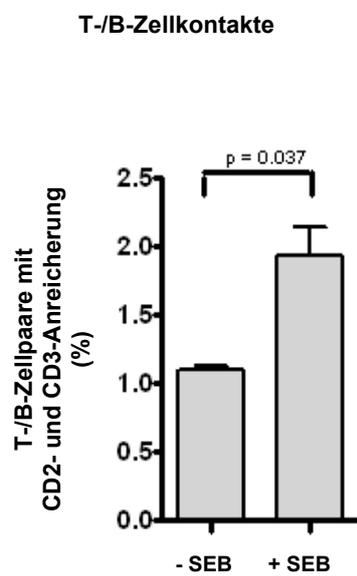
Die Ausbildung der immunologischen Synapse ist eines der wichtigsten Ereignisse während der T-Zellaktivierung. Hierbei wird das Zytoskelett der Zelle in großem Maße reorganisiert, um den bestmöglichen Kontakt zur APZ herzustellen. Das identifizierte Cofilin-1 ist ein Aktin-bindendes Protein, welches an diesem Prozess aktiv beteiligt ist. Cofilin ist entscheidend für die Aktin-Polymerisation und Depolymerisation und somit auch für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. *In vitro* kann Cofilin an G- und F-Aktin binden, Aktinfilamente schneiden und depolymerisieren sowie eine verstärkte Polymerisation auslösen (Bamburg 1999, Condeelis 2001). Da bei Argininabwesenheit aufgrund fehlender bzw. reduzierter Dephosphorylierung die inaktive phosphorylierte Form dieses Proteins verstärkt vorhanden ist, wurde die Auswirkung dieser fehlenden Dephosphorylierung auf die Ausbildung der Immunologischen Synapse mittels ImageStream[®] (Durchflusszytometer mit integriertem Fluoreszenz-Mikroskop, Kap. 2.2.11) untersucht. Für diese Analyse wurden humane T-Zellen über Nacht in argininhaltigem oder argininfreiem Medium präinkubiert und am nächsten Tag mit Superantigen beladenen B-Zellen oder unbeladenen B-Zellen stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Fokus auf den T-Zell-/ B-Zellkontakt gemessen, indem die Akkumulation von CD3 und CD2 im Kontaktbereich nach T-Zell-Aktivierung mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper detektiert wurde. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Kernfarbstoff Hoechst gefärbt, um die Zellen sichtbar zu machen und nur die T-Zell-/ B-Zellpaare untersuchen zu können.

Die Messungen zeigten, dass bei Argininmangel die Ausbildung von T-Zell-/B-Zellkontakten reduziert war (s. Abb. 3.5B). Ferner ist innerhalb der ausgebildeten T-B-Kontaktzonen eine signifikant verminderte Akkumulation von CD3- und CD2-Rezeptoren im Kontaktbereich zu messen (s. Abb.3.5 A, C und D).

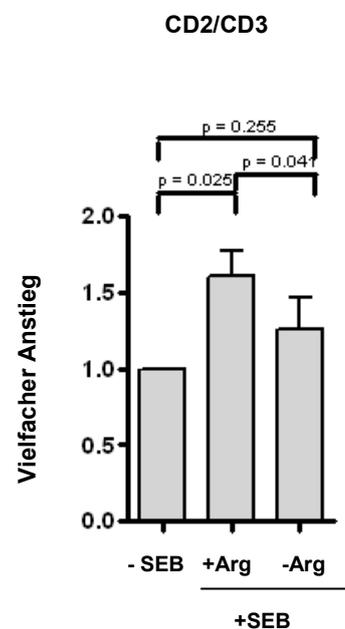
A.



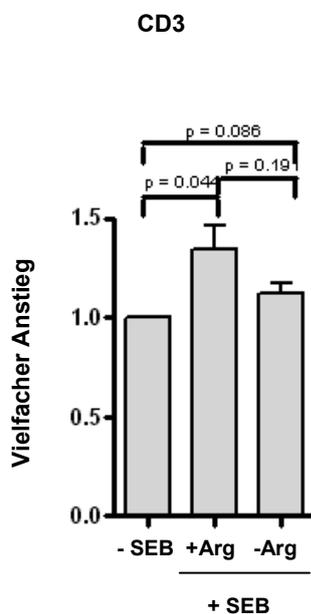
B.



C.



D.



E.

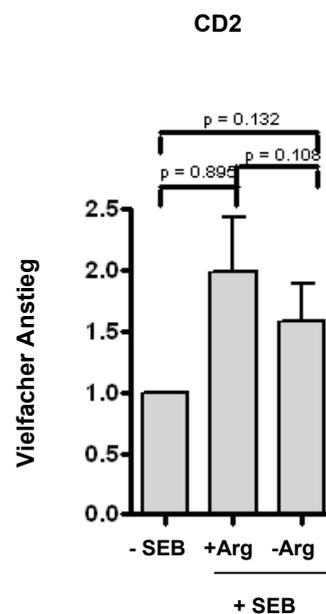


Abb.3.5: Ausbildung der immunologischen Synapse in Abhängigkeit von Arginin: Image®Stream Analyse der Kontaktzone zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden B-Zellen. Humane T-Zellen wurden mit SEB-beladenen B-Zellen in An- oder Abwesenheit von Arginin koinkubiert und die T-/ B-Zellkontakte wurden mittels Image®Stream untersucht. Hierbei wurde die Ausbildung der Kontakte und die Ansammlung von CD3 und CD2 in diesem Bereich gemessen. **A.** Repräsentative Aufnahmen multispektraler Messungen einzelner Zellkontakttereignisse bei Stimulation in argininfreiem [(-)Arginin] oder argininhaltigem [(+)Arginin] Medium mit SEB-Superantigen beladenen Raji B-Zellen (untere Reihe) bzw. unbeladenen B-Zellen (obere Reihe) mittels Image®Stream. Zur Darstellung einzelner Zellen wurden diese mit dem Kernfarbstoff Hoechst (blau) gefärbt. Um die Akkumulation von CD3 und CD2 in der sich entwickelnden immunologischen Synapse zu analysieren, wurde mit anti-CD3-PE/TexasRed und mit anti-CD2-FITC gefärbt. Pro Probe wurden jeweils 20.000 Ereignisse gemessen. Am Ende jeder Messreihe ist eine Überlagerung zu sehen (merge). **B.** Die Grafische Darstellung zeigt die kombinierte relative Fluoreszenzintensität innerhalb der Kontaktzone in An- oder Abwesenheit von Arginin, welche die relative Menge reifer immunologischer Synapsen, mit Akkumulation von CD3 und CD2 repräsentiert. **C.** Die Grafik zeigt die Anreicherung von CD2 und CD3 kombiniert in der Kontaktzone in An- und Abwesenheit von Arginin. **D.** und **E.** Grafische Darstellung der Einzelwerte der CD2- und CD3-Akkumulation im Kontaktbereich bei Argininanwesenheit und Argininabwesenheit. Zur Auswertung wurde der Student's t-test angewendet. Gezeigt sind als Werte die Mittelwerte mit Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

3.6 Einfluss von Arginin auf den F-Aktin Gehalt aktivierter humaner T-Lymphozyten

F-Aktin ist als Bestandteil des Aktin-Zytoskeletts u.a. entscheidend an dessen dynamischer Reorganisation bei T-Zell-Aktivierung beteiligt. Durch Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktinfilamenten werden Prozesse wie intrazellulärer Proteintransport und Zellfortbewegung reguliert. Da sich während der Ausbildung der Immunologischen Synapse das Zytoskelett der T-Zelle zur APZ hinbewegen muss und Proteine wie CD3 und CD2 vermehrt an die Kontaktstellen rekrutiert werden, ist es von großer Bedeutung, dass F-Aktin dementsprechend vermehrt gebildet wird (Samstag et al. 2003). Um zu untersuchen, ob die bei Argininmangel feststellbare fehlende Dephosphorylierung von Cofilin-1 sowie die verminderte Bildung der Immunologischen Synapse (Abb.3.5) mit einem veränderten F-Aktin Gehalt in Verbindung stehen, wurde das intrazelluläre F-Aktin mittels Durchflusszytometrie (Kap. 2.2.5.2) gemessen. Die Zellen wurden hierzu mit FITC-markiertem Phalloidin, einem Pilzgift, welches in den Zellen an F-Aktin bindet und dessen Depolymerisation verhindert, gefärbt. Anhand des gebundenen fluoreszenz-markierten Phalloidin kann somit über die Fluoreszenzintensität der Gehalt an F-Aktin in den Zellen bestimmt werden.

Die Auswertung der FACS-Messungen erfolgte anhand des gesamten gemessenen Zellpools über die charakteristischen Parameter Größe im "forward scatter" (FSC) gegen Granularität im "side scatter" (SSC). Für die Analyse des intrazellulären F-Aktin Gehalts wurde ausgehend von der zuvor ausgewählten T-Zellpopulation auf CD3⁺ und Phalloidin-positive T-Zellen selektiert, um die B-Zellen auszuschließen. Somit wurde der intrazelluläre F-Aktin Gehalt nur in CD3⁺ T-Zellen analysiert (Abb.3.6.1). Als Kontrollzellen zur Setzung der Quadrantengates dienten ungefärbte T-Zellen. Bei der Stimulation mit anti-CD3/-CD28 wurde gleich verfahren. Die aufgrund der Selektion angezeigten Mittelwerte geben die durchschnittliche Fluoreszenz an, d.h. je höher die Fluoreszenz, desto mehr F-Aktin ist in der Zelle vorhanden. Es folgte eine statistische Analyse (gepaarter Student's t-Test, Mittelwert +/- SD), hierbei wurden jeweils die Werte der Ergebnisse einer Stimulationsart und -zeit für die verschiedenen Medien verglichen (Abb.3.6.2).

Humane T-Lymphozyten wurden mittels anti-CD3/ -CD28 bzw. mittels SEB-beladenen B-Zellen stimuliert. In 3 - 8 Zeitkinetik-Experimenten wurde der F-Aktin Gehalt in den T-Zellen nach 15, 30, 60 min bzw. 6h, 24h und 48h bestimmt. Hierbei zeigte sich ausschließlich

nach 48 h eine signifikante Veränderung des F-Aktingehaltes in Abhängigkeit von An- oder Abwesenheit von Arginin (Abb 3.6.2A). Interessanterweise fand sich in Abhängigkeit von der Stimulationsart (Antikörper-Stimulation bzw. APZ-basiert) jedoch eine diametral entgegengesetzte Regulation des F-Aktingehaltes. Bei der Stimulation mit anti-CD3/-CD28 fand sich bei Abwesenheit von Arginin ein signifikant ($p=0.0133$) reduzierter F-Aktingehalt, während bei Stimulation mit Superantigen-beladenen B-Zellen bei Fehlen von Arginin im Rahmen der Stimulation signifikant mehr F-Aktin in den humanen T-Zellen nachweisbar war ($p=0.0099$) (Abb 3.6.2A). In Abbildung 3.6.2A ist ferner zum Vergleich ein früher Zeitpunkt nach 15 min Stimulation gezeigt. Hier waren keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Arginin bzw. relativ zu unstimulierten Kontrollzellen zu erkennen

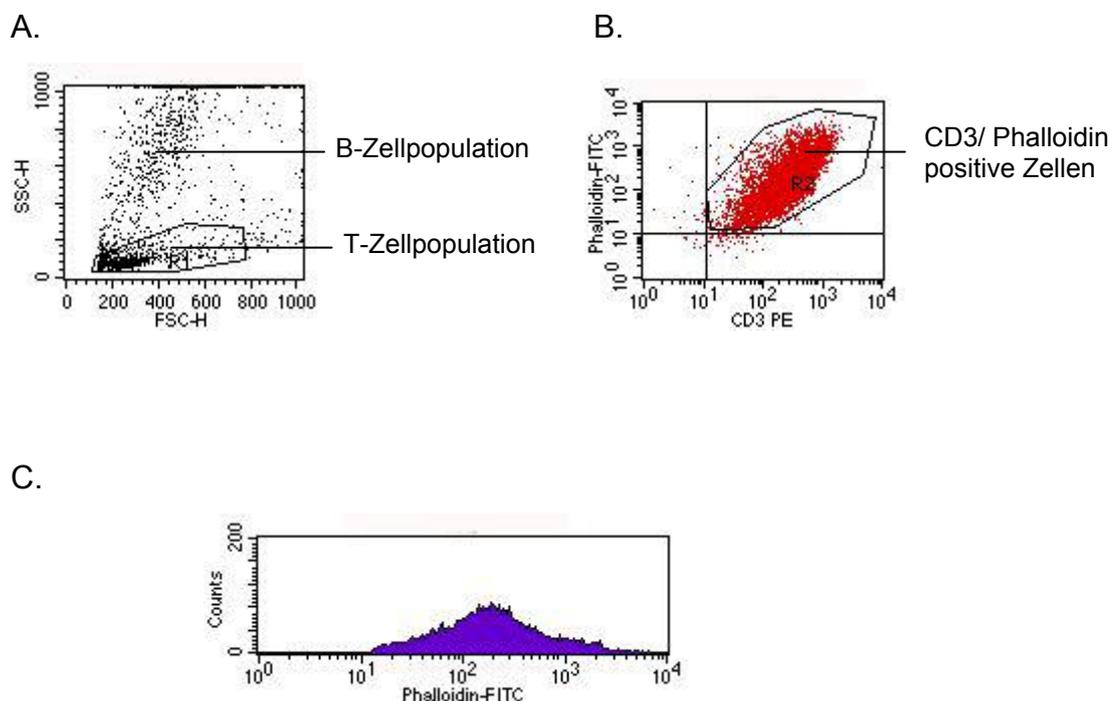
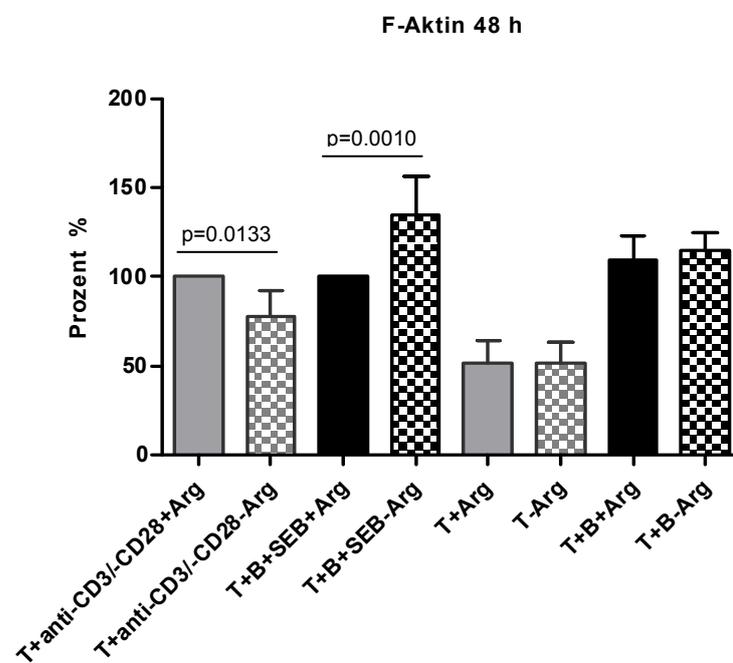
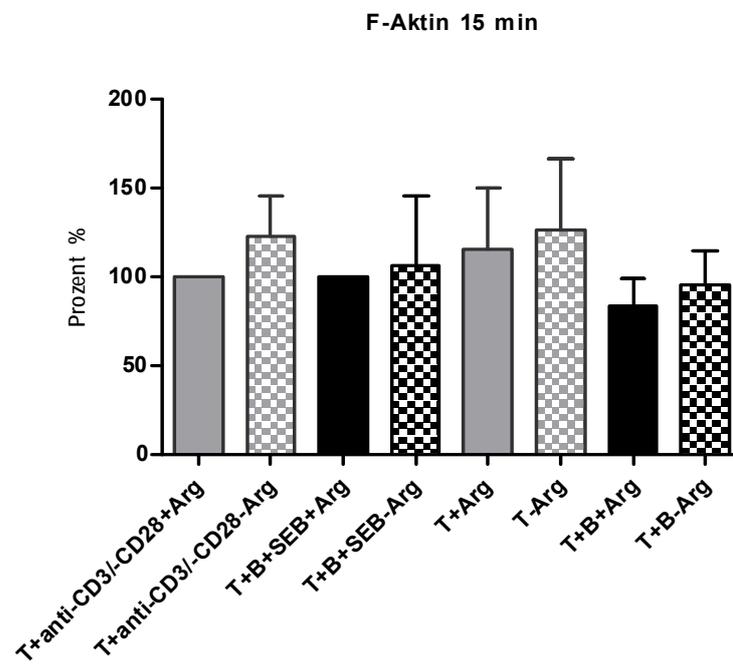


Abb.3.6.1: Auswertestrategie für intrazelluläre durchflusszytometrische F-Aktinmessung von T-Zellen. Zur Untersuchung des intrazellulären F-Aktingehalts wurden je 20 000 Zellen gezählt. **A.** Die T-Zellen wurden durch Nachweis der CD3-Expression ausgewählt und nach **B.** CD3/Phalloidin doppelt positiven Zellen selektiert. Der Quadrant wurde anhand der Negativkontrolle (ungefärbte T-Zellen) gesetzt. **C.** Anhand eines Histogramms wurde die Fluoreszenzintensität des Phalloidins (= F-Aktingehalt) angezeigt.

A.



B.

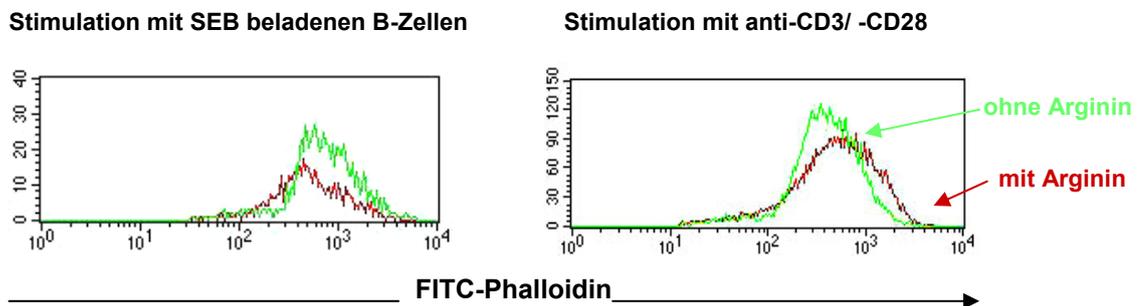


Abb.3.6.2: Messen des intrazellulären F-Aktin Gehalts der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Humane T-Zellen wurden 15 min oder 48 h in argininhaltigem (+Arg) oder argininfreiem (-Arg) Medium mit anti-CD3/-CD28 (T+anti-CD3-CD28) oder mit bestrahlten SEB-beladenen B-Zellen (T+B+SEB) stimuliert und anschließend mit FITC-Phalloidin gefärbt. Als Kontrollen wurden T-Zellen alleine und T-Zellen mit unbeladenen B-Zellen in den beiden Medien parallel inkubiert. **A.** Analyse der Daten von jeweils 6 unabhängigen Experimenten pro Zeitpunkt mittels gepaartem Student's t-Test (Mittelwert +/- Standardabweichung). Die Werte der in argininhaltigem (T+anti-CD3/-CD28+Arg/ T+B+SEB+Arg) Medium stimulierten Zellen wurden jeweils auf 100% normiert, um eine bessere interexperimentelle Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Auch die Kontrollen wurden jeweils auf diesen Wert bezogen. **B.** Overlay-Histogramm eines repräsentativen Experiments nach 48 h Stimulation mit SEB-beladenen B-Zellen (links) oder anti-CD3/-CD28 (rechts) in argininhaltigem (rot) oder argininfreiem Medium (grün).

3.7 Einfluss von Arginin auf die Chemotaxis humaner T-Lymphozyten

Die Migration ist eine wichtige T-Zell-Effektorfunktion, welche auf die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts angewiesen ist. Bei einer Zellfortbewegung wie der Migration, werden F-Aktinfilamente auf einer Seite der Zelle abgebaut und auf einer anderen wieder aufgebaut und in Bewegungsrichtung der Zelle polarisiert. Es bildet sich eine sogenannte Zellfront, die „leading edge“, in der sich das F-Aktin anreichert und zu einem dichten Netzwerk wird. Ist die F-Aktinbildung gestört, so könnte sich das auch auf die Migration der T-Zellen, ein entscheidender Prozess bei der T-Zellantwort, auswirken (Samstag et al. 2003).

Um die chemotaktische Migration primärer humaner T-Zellen zu untersuchen, wurde als Modellsystem ein Migrationsassay (Kap. 2.2.12) mit dem Chemokin SDF-1 α als Chemotaktikum im Labor etabliert. Für diese Messung wurde ein 2-Kompartiment-System mit einer oberen und einer unteren Kammer, getrennt durch einen Membranfilter, verwendet. In die untere Kammer wurde argininhaltiges oder argininfreies Medium mit oder ohne das Chemokin SDF-1 α gegeben. In die obere Kammer wurden die T-Zellen

gegeben, die in dem jeweiligen Medium über Nacht präinkubiert worden waren. Als Bezugswert (100%) wurden in die untere Kammer T-Zellen im entsprechenden Medium gegeben. Die Anzahl der gewanderten T-Zellen wurde nach 5 h im Durchflusszytometer gemessen.

Es konnten keine Unterschiede in der chemotaktischen Migration der T-Zellen in Abhängigkeit von extrazellulärem Arginin festgestellt werden. In argininfreiem Medium lag der prozentuale Anteil der gewanderten Zellen bei durchschnittlich $53 \pm 21,1\%$, in argininhaltigem Medium bei $50 \pm 30\%$. Die Spontanmigration lag bei (+)Arginin-Medium bei durchschnittlich $7,8 \pm 5,5\%$, und bei (-)Arginin-Medium bei $9,5 \pm 7\%$ (Abb.3.7).

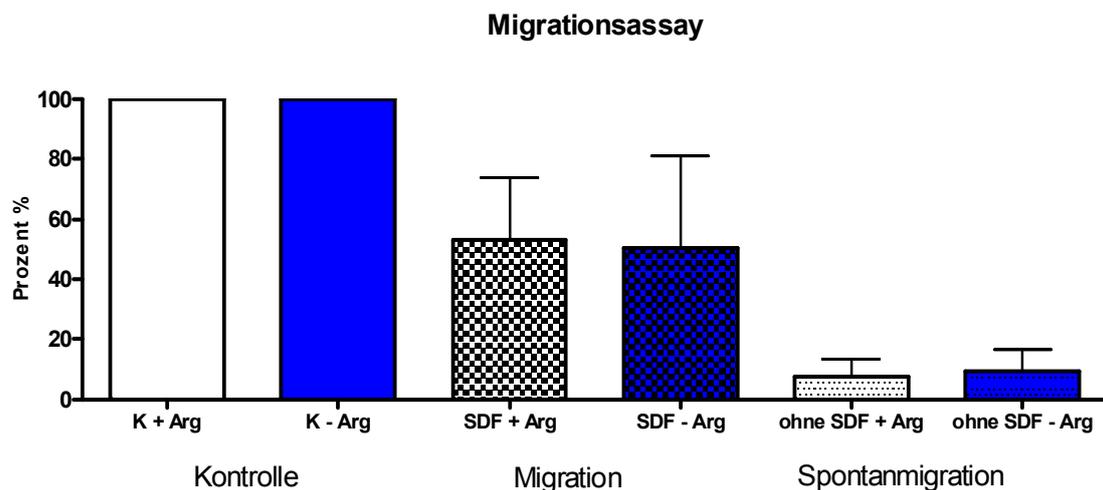


Abb.3.7: Durchflusszytometrische Bestimmung der chemotaktischen Migration humaner T-Zellen. Humane T-Zellen wurden in argininhaltigem (+Arg) oder argininfreiem (-Arg) Medium in einem 2-Kompartiment-System (obere Kammer: T-Zellen; untere Kammer: Chemokin) mit SDF-1 α (SDF+Arg/ -Arg) oder ohne SDF-1 α (ohne SDF+Arg/ -Arg, entspricht der Spontanmigration der T-Zellen in das untere Kompartiment) inkubiert. Als 100% Wert/ Kontrolle wurden jeweils die eingesetzte Anzahl an T-Zellen in dem jeweiligem Medium (K+Arg, K-Arg) gemessen. Nach 5 h Inkubation wurde die Anzahl der T-Zellen im unteren Kompartiment in den verschiedenen Medienbedingungen ausgezählt und in Relation zur maximal möglichen Migration (= 100%) gesetzt. Die Grafik zeigt die Zusammenfassung von vier unabhängig durchgeführten Experimenten, dargestellt sind jeweils Mittelwert +/- Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test. Die Kontrollwerte wurden auf 100% gesetzt.

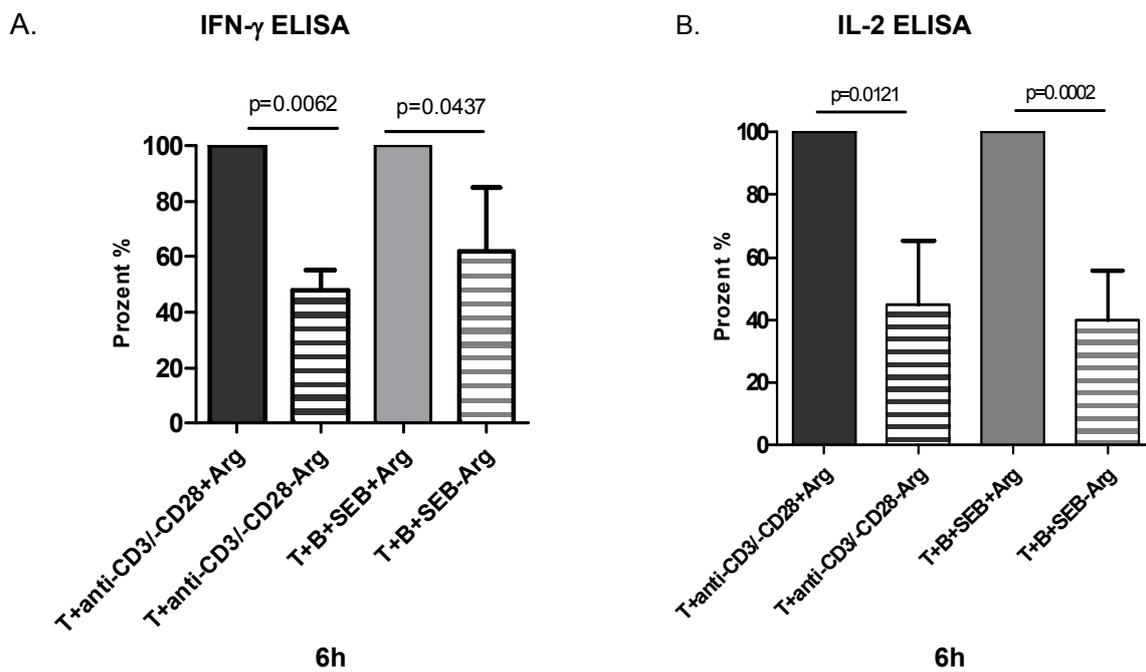
3.8 Regulation der Zytokinsynthese und -sekretion in humanen T-Zellen bei Stimulation in argininfreiem Medium

3.8.1 Extrazelluläres IFN- γ und IL-2

Das Fehlen von Arginin führt zu einer signifikanten Suppression der Synthese von IFN- γ durch primäre humane T-Lymphozyten (Munder et al. 2006). Dieser Suppression liegt offenbar eine posttranskriptionelle Inhibition zugrunde, da die IFN- γ mRNA Produktion bei T-Zell-Stimulation unabhängig von der Argininkonzentration ist (Munder et al. 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass die Sekretion von IFN- γ bei Blockierung der Bindefähigkeit von Cofilin an F-Aktin gestört ist (Eibert et al. 2004). Neben IFN- γ sezernieren humane T-Lymphozyten bei Aktivierung auch andere spezifische Zytokine. Von großer Bedeutung für Wachstum, Zellteilung und Expansion einer T-Zellpopulation ist hierbei das Zytokin IL-2, welches nach Sekretion durch die T-Zellen auto- oder parakrin wesentlich für die Expansion der T-Zellpopulation ist. Ein Defekt der IL-2 Produktion könnte u.a. die Suppression der T-Zellproliferation bei Argininmangel partiell oder komplett erklären. Um festzustellen, ob diese Effektorantwort bei Argininmangel ebenfalls gehemmt ist, wurde die Synthese von IL-2 und – im Vergleich – IFN- γ nach T-Zellaktivierung mittels ELISA (Kap. 2.2.7.1) im Zellkulturüberstand gemessen (Abb. 3.8.1). Die früheren Untersuchungen zur Inhibition von IFN- γ wurden ferner durch umfangreiche Zeitkinetik-Analysen sowie um den Vergleich von zwei unterschiedlichen Stimulationsarten (antikörper-basiert versus APZ) erweitert.

Die bekannte Suppression der IFN- γ Produktion zeigte sich im Zellkulturüberstand bereits sehr früh im Rahmen der T-Zell-Aktivierung. Sowohl bei Stimulation mittels anti-CD3/-CD28 wie auch bei Aktivierung mittels APZ fand sich bei Argininabwesenheit schon nach 6 h eine signifikant geringere Konzentration an IFN- γ bei beiden Stimulationsarten (anti-CD3/-CD28: Reduktion um $52,1 \pm 7,1\%$, $p=0.0062$; Superantigen beladene B-Zellen: Reduktion um $37,8 \pm 22,5\%$, $p=0.0437$). Im Rahmen der protrahierten Stimulation wurden diese argininabhängigen Unterschiede der IFN- γ Konzentrationen im Zellkulturüberstand bis hin zum letzten Messzeitpunkt ($t= 96$ h) immer größer ($t= 96$ h: anti-CD3/-CD28: Reduktion um $87,1 \pm 6,5\%$, $p=0.0019$; Superantigen beladene B-Zellen: Reduktion um $80,4 \pm 4,4 \%$, $p=0.001$) (Abb. 3.8.1A).

Bei der Bestimmung von IL-2 im Überstand zeigte sich initial (t= 6h) ebenfalls eine Reduktion der Zytokinkonzentration bei Arginindepletion (anti-CD3/-CD28: Reduktion um $54,9 \pm 20,2$ %, $p=0.0121$; Superantigen beladene B-Zellen: Reduktion um $60.1 \pm 15,6$ %, $p=0.0002$). Im weiteren Verlauf des Experimentes war allerdings eine zunehmende Angleichung der Zytokinkonzentrationen in den Überständen mittels IL-2 ELISA messbar (Abb. 3.8.1B), so dass schließlich z.B. zum Zeitpunkt t=96 h keine argininabhängigen Unterschiede in der IL-2 Menge im Überstand mehr messbar waren (anti-CD3/-CD28: IL-2 Konzentration im argininfreien Medium entspricht $120 \pm 71,3$ % der in argininhaltigem Medium, $p= 0.5642$; Superantigen beladene B-Zellen: IL-2 Konzentration im argininfreien Medium entspricht $162,8 \pm 130,3$ % der in argininhaltigem Medium, $p= 0.3416$) (Abb. 3.8.1B).



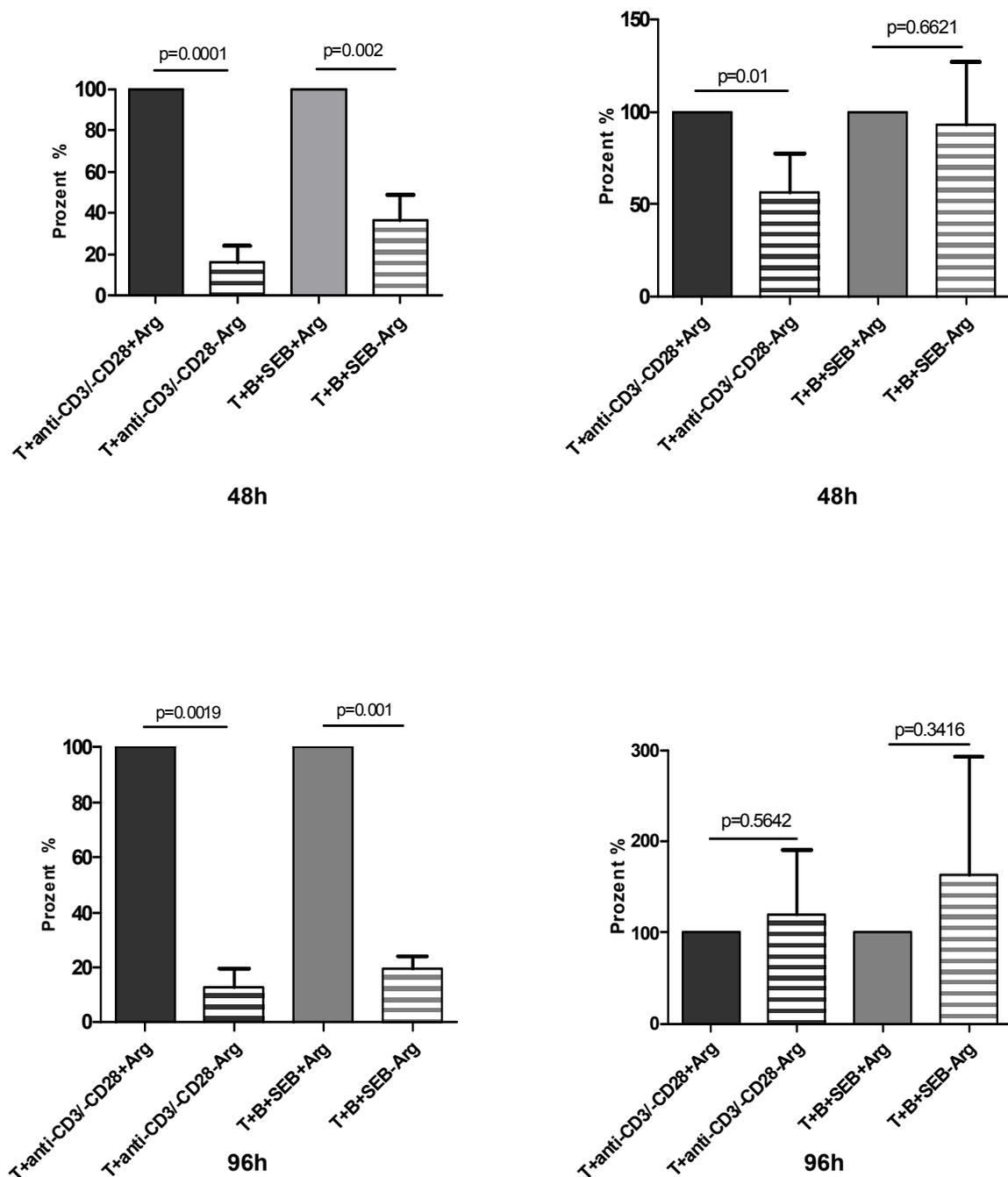


Abb.3.8.1: Einfluss von Arginin auf die Synthese von IL-2 und IFN- γ nach Stimulation humaner T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden 6 h, 48 h und 96 h in argininhaltigem (+Arg, gefüllte Balken) oder argininfreiem Medium (-Arg, Balken mit Muster) mit anti-CD3/-CD28 (beads) oder mit SEB-beladenen B-Zellen (B+SEB) stimuliert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die zellfreien Überstände gerntet und die Konzentrationen der Zytokine mittels ELISA gemessen. Gepoolte Analyse der IFN- γ (A) und IL-2 (B) ELISA-Daten mittels gepaartem *Student's t-Test* von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind je die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten wurden die Werte für Zellen, die in argininhaltigem Medium stimuliert wurden, auf 100 % gesetzt.

3.8.2 Intrazelluläres IFN- γ und IL-2

Nachdem sich in den Messungen zum extrazellulär akkumulierenden IFN- γ und IL-2 in den ELISA-Experimenten gezeigt hatte, dass – im Gegensatz zu IFN- γ – humane T-Lymphozyten bei Arginindefizienz nach einer initial verzögerten IL-2 Produktion im weiteren Verlauf keinen Defekt in der Synthese von IL-2 aufweisen, sollte diese Diskrepanz zwischen den beiden Zytokinen weiter analysiert werden. Da offenbar kein genereller Zytokin-Synthesedefekt bei Abwesenheit von Arginin in humanen T-Zellen vorliegt (Abb 3.8.1B) und ferner die aktivierungsabhängige Transkription von IFN- γ bei Arginindefizienz vollkommen intakt ist (Munder et al. 2006), könnte die fehlende IFN- γ Akkumulation im Zellkulturüberstand auf einem posttranskriptionellen Synthesedefekt oder auf einem Sekretionsdefekt des Translationsproduktes beruhen. Zur Klärung dieser Frage bot sich hierfür die Technik der intrazellulären Zytokinmessung mittels Durchflußzytometrie an (Kap.2.2.5.1).

Bei IL-2 zeigte sich bei Stimulation der T-Zellen mittels anti-CD3/ -CD28 bzw. mit SEB-beladenen B-Zellen eine initial (z.B. bei Stimulation mit anti-CD3/-CD28 nach 6h: Reduktion um $49,1 \pm 22,3\%$) verzögerte Zytokinsynthese intrazellulär. Im weiteren Verlauf (z.B. bei Stimulation mit anti-CD3/-CD28 nach 48h: Anstieg um $52,4 \pm 94,4\%$ im Vergleich zur Stimulation in argininhaltigen Medium) gleicht sich diese protrahierte IL-2 Expression bei Abwesenheit von Arginin jedoch an, während an den späten Zeitpunkten (72 h, 96 h) (Abb. 3.8.2.2B), vermutlich aufgrund der bereits erfolgten vollständigen Sekretion des Zytokins, keine relevante intrazelluläre Expression von IL-2 mehr messbar ist. Ein repräsentatives Experiment wird jeweils in Abb. 3.8.2.1A. (Antikörper-basierte Stimulation) und Abb.3.8.2.1B. (APZ-basierte Stimulation) gezeigt.

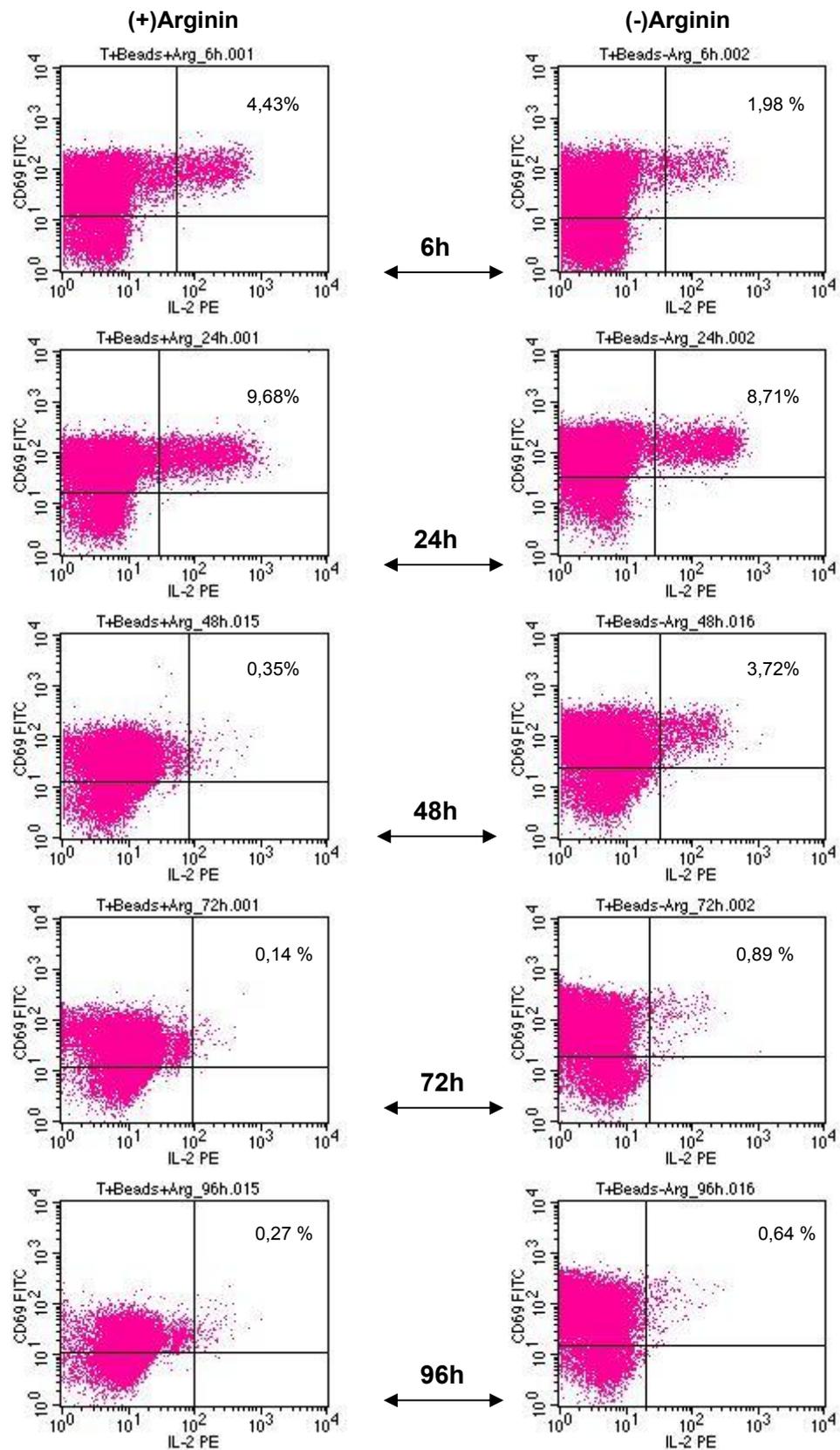
Im Fall von IFN- γ ist die Reduktion der zytokinproduzierenden T-Zellen initial zum Zeitpunkt $t=6$ h bei Stimulation in argininfreiem und argininhaltigem Medium vergleichbar, wobei tendenziell bei Argininmangel weniger Zellen IFN- γ intrazellulär exprimieren (Stimulation mit anti-CD3/-CD28: Reduktion um $24,9 \pm 15,7\%$; SEB Stimulation: $22,8 \pm 23,75\%$). Im weiteren Verlauf ist bei Stimulation in Argininabwesenheit nach 48 h eine reduzierte Frequenz IFN- γ^+ T-Zellen im Vergleich zur Stimulation in argininhaltigem Medium messbar (Stimulation mit anti-CD3/-CD28: Reduktion um $40,2 \pm 38,9\%$; SEB Stimulation: $49,8 \pm 33,7\%$ in argininfreiem Medium) (Abb.3.8.2.2A). Zu den späteren Zeitpunkten (72 h, 96 h) ist – vergleichbar den Ergebnissen von IL-2 – auch keine relevante intrazelluläre Expression von IFN- γ mehr feststellbar. Ein repräsentatives

Experiment wird jeweils in Abb. 3.8.2.1C. (Antikörper-basierte Stimulation) und Abb.3.8.2.1D. (APZ-basierte Stimulation) gezeigt.

A.

Stimulation mit anti-CD3/-CD28

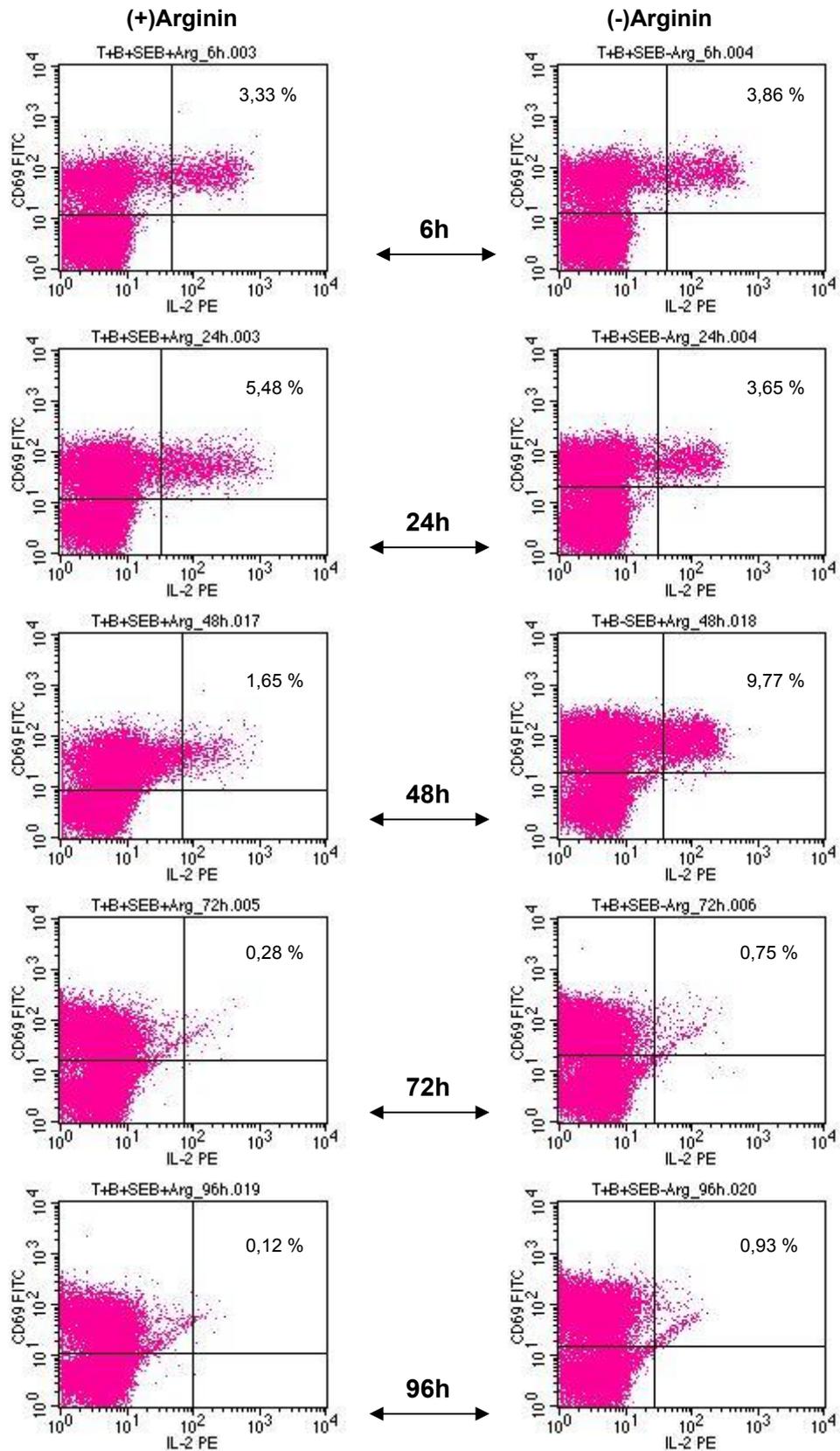
IL-2



B.

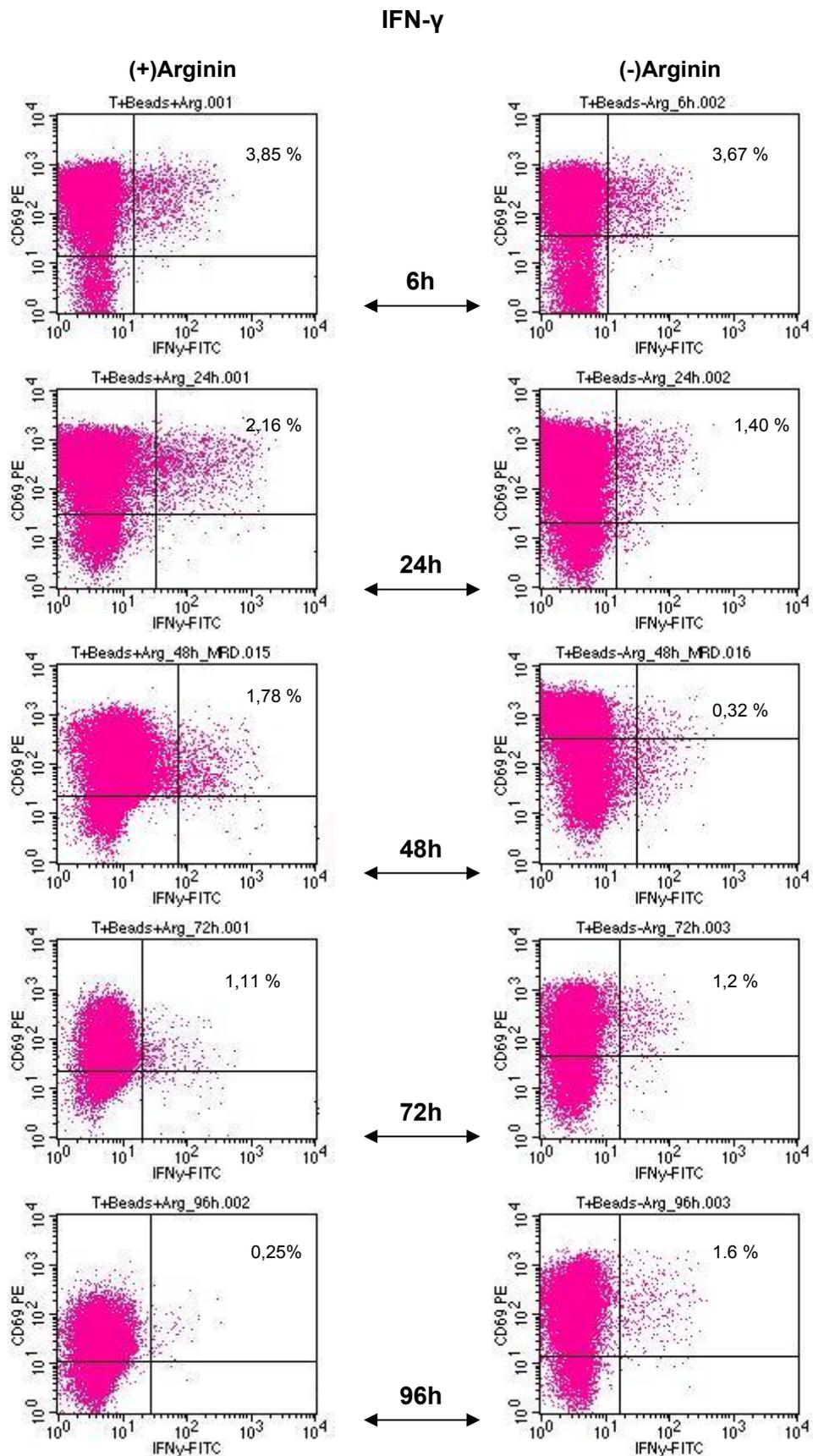
Stimulation mit SEB beladenen B-Zellen

IL-2



C.

Stimulation mit anti-CD3/-CD28



D.

Stimulation mit SEB beladenen B-Zellen

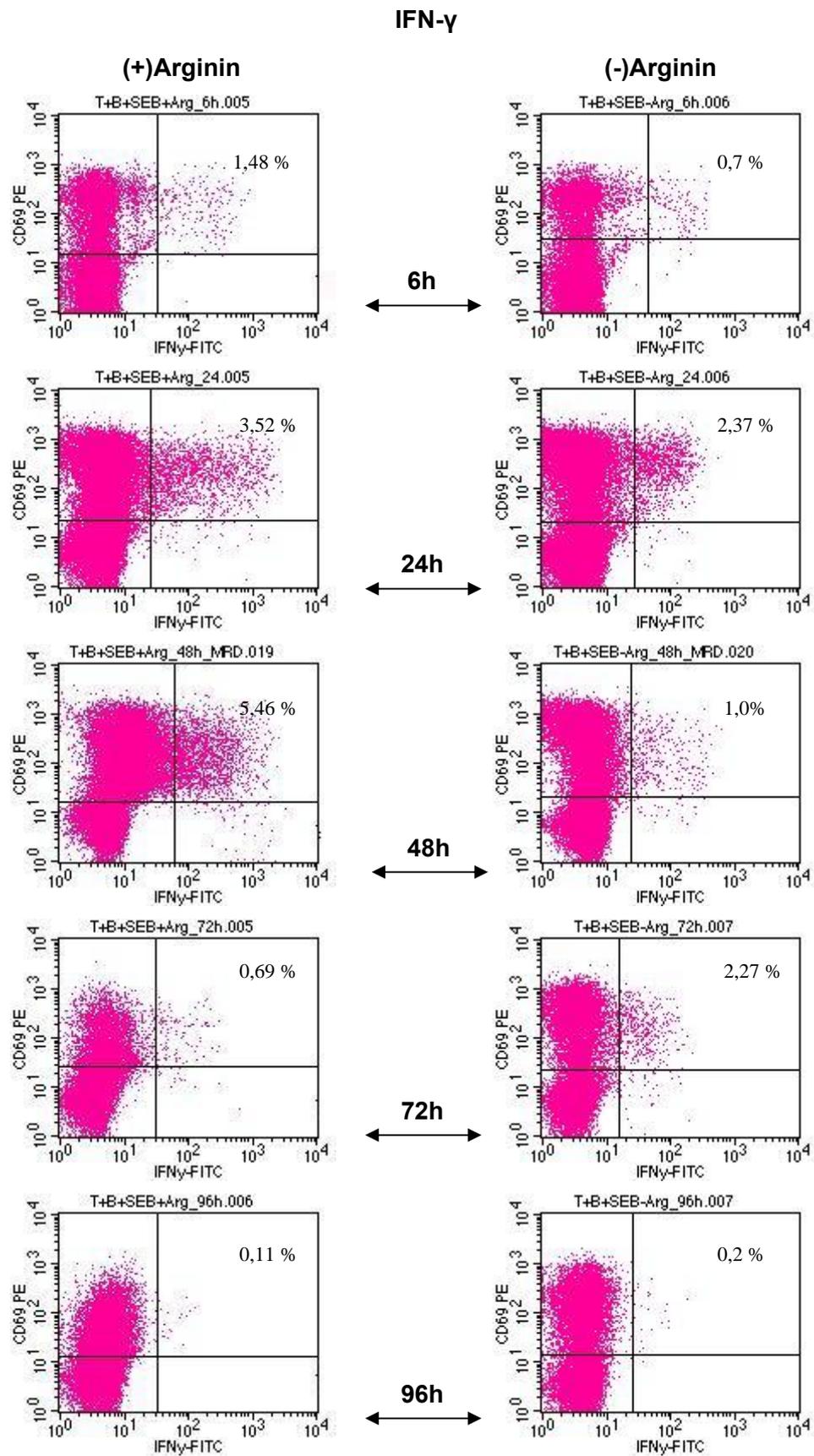
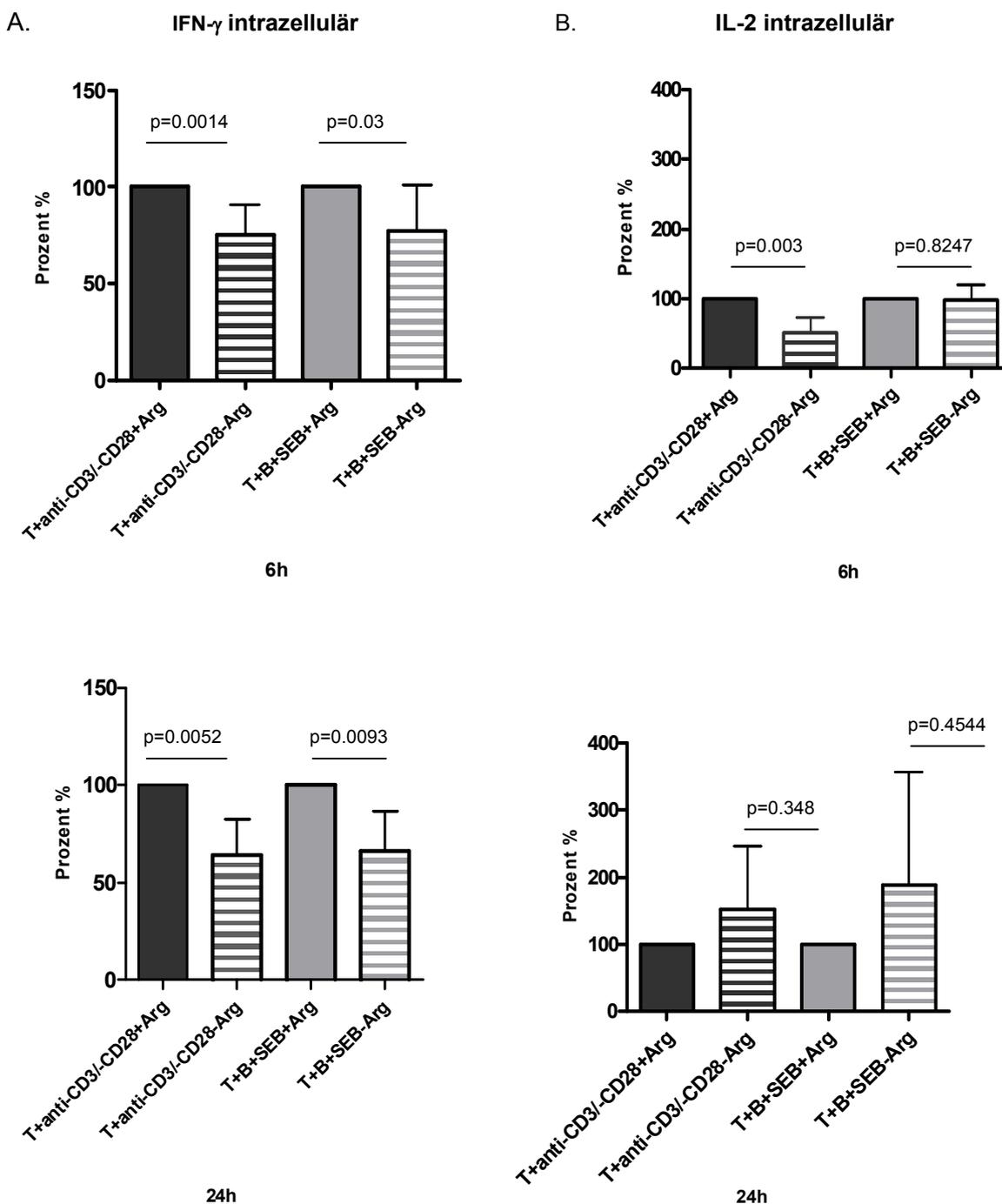


Abb.3.8.2.1: Bestimmung der intrazellulären Expression von IL-2 und IFN- γ mittels Durchflusszytometrie. Humane T-Zellen wurden 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in argininhaltigem (+ Arginin) oder argininfreiem (- Arginin) Medium mit anti-CD3/-CD28 (beads) oder SEB-beladenen B-Zellen stimuliert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde die intrazelluläre Expression von IL-2 (A. (=Beads)+ B. (=SEB)) und IFN- γ (C. (=Beads)+ D. (=SEB)) nach entsprechender Färbung mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die Quadrantengates wurden entsprechend der Kontrollen (Färbungen mit entsprechenden Isotypantikörpern) gesetzt. Im rechten oberen Quadranten sind jeweils die Frequenzen der aktivierten (CD69+) T-Zellen angegeben, welche intrazellulär **IFN- γ** exprimieren. Die gezeigten Dotplots stammen aus je einem unabhängigen Experiment von insgesamt 3-8 Experimenten.



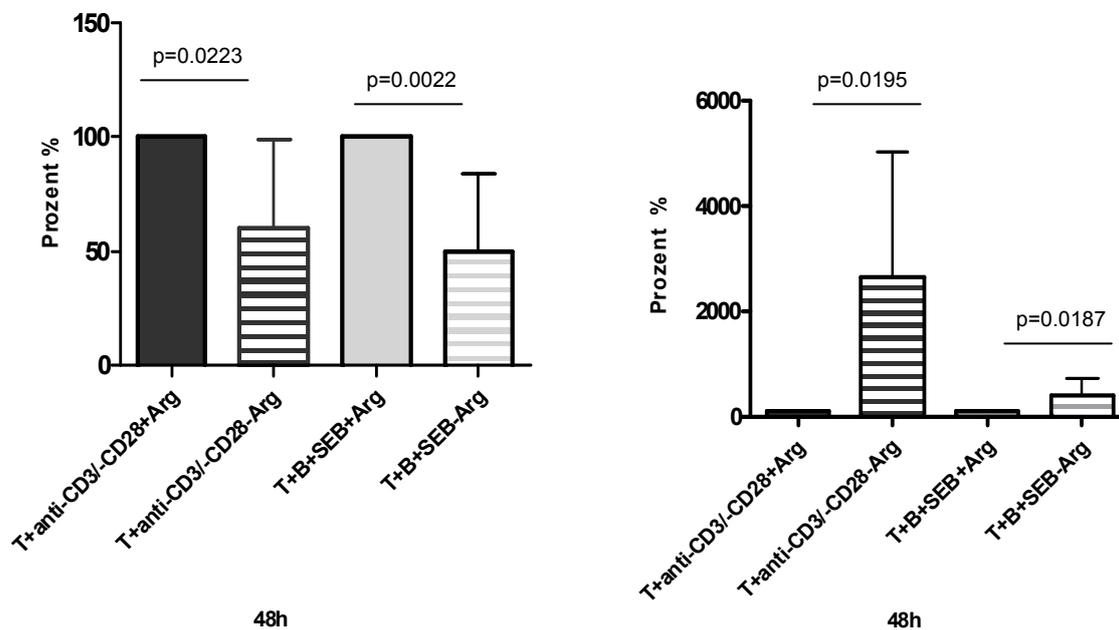


Abb.3.8.2.2: Quantifizierung und statistische Auswertung der intrazellulären Expression von IFN- γ und IL-2 in aktivierten humanen T-Zellen in Abhängigkeit von Arginin. Analysiert wurden sämtliche Experimente zur intrazellulären Zytokinexpression (n= 3-8 für SEB-Stimulation, n= 3-8 für anti-CD3/-CD28-Stimulation) Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der intrazellulär Zytokin-exprimierenden T-Zellen (in %) für IFN- γ (A) und IL-2 (B). Die statistische Auswertung zur Ermittlung der Signifikanz (p-Werte sind in den einzelnen Diagrammen oberhalb der jeweiligen Balken angegeben) erfolgte mit Hilfe des gepaarten Student's t-test.

Diese Daten sprechen zusammenfassend gegen einen Sekretionsdefekt als Ursache der reduzierten extrazellulären IFN- γ Konzentration bei T-Zell-Stimulation in Argininmangel. Offenbar liegt vielmehr eine posttranskriptionelle Synthesestörung für IFN- γ vor. Im Gegensatz hierzu ist die Synthese von IL-2 im Wesentlichen unbeeinträchtigt durch das vollständige Fehlen der Aminosäure Arginin.

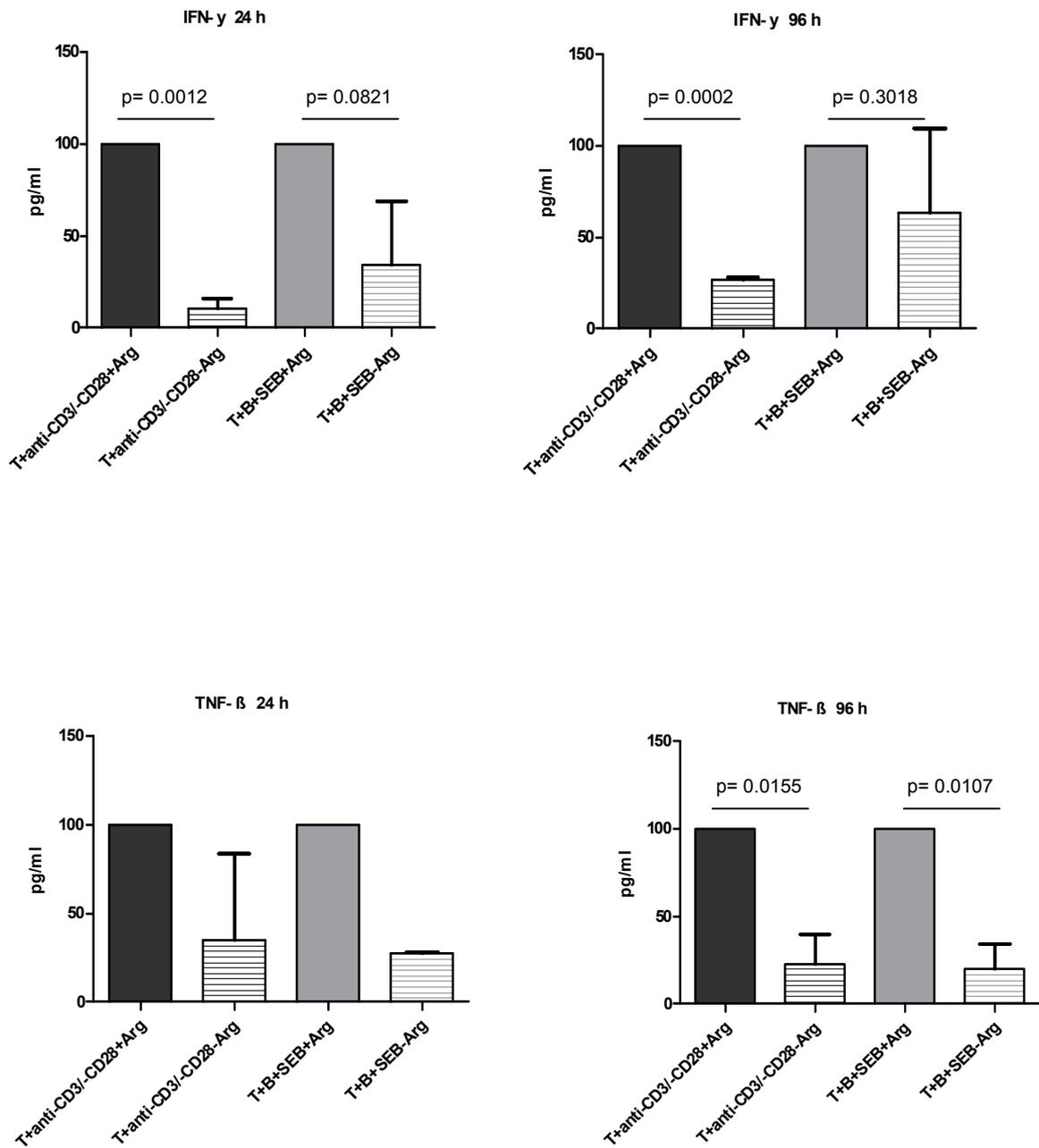
3.9 Weitere Zytokine

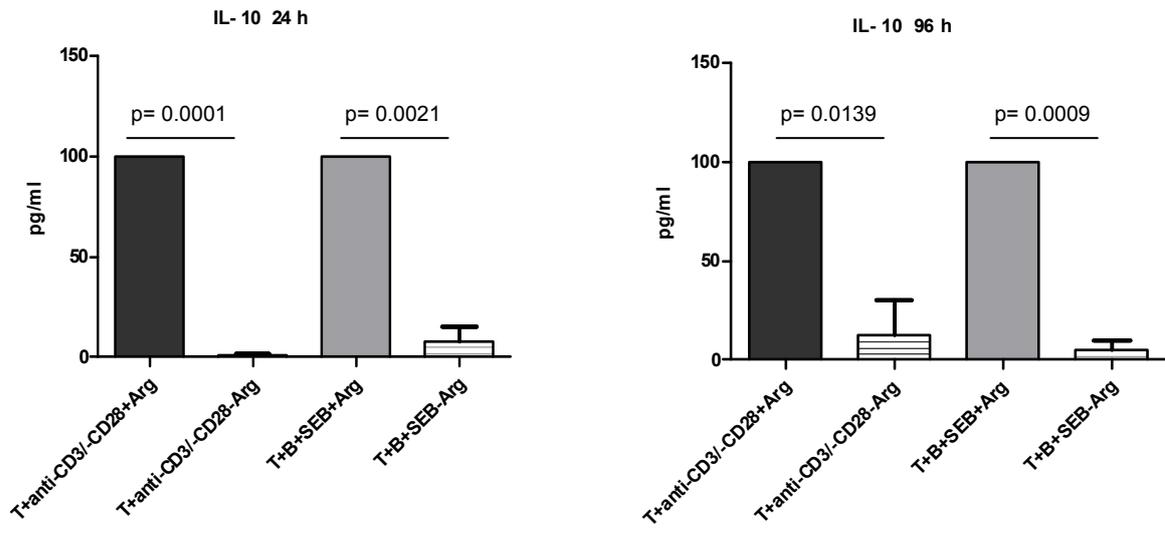
Nachdem die detaillierten Analysen zur Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- γ gezeigt hatten, dass bei Arginindefizienz zytokinspezifische Regulationsmechanismen in humanen T-Zellen vorliegen, sollten weitere wichtige pro- und antiinflammatorische Zytokine diesbezüglich analysiert werden. Hierzu bot sich die Technik der Zytokin-Quantifizierung mittels Multiplex-Analyse an, da so aus einer Probe parallel viele Zytokine gemessen

werden können. Es wurden T-Zellen für 24 h oder 96 h in argininhaltigem oder argininfreiem Medium stimuliert und die Zellkulturüberstände anschließend für die Multiplex-Analysen (Kooperation mit Herrn Dr. Martin Schiller; Medizinische Universitätsklinik Heidelberg) geerntet. Als validierende Kontrolle im Vergleich zu den Untersuchungen mittels ELISA (3.8.1) und intrazellulärer durchflußzytometrischer Analyse (3.8.2) wurden erneut auch die Zytokine IL-2 und IFN- γ mittels Multiplex-Analyse bestimmt. In drei voneinander unabhängigen Experimenten mit primären humanen T-Lymphozyten von unterschiedlichen gesunden Blutspendern zeigte sich eine reproduzierbare Dichotomie in der Zytokinregulation bei Arginin-Defizienz. Es fand sich – analog der für IFN- γ beobachteten Suppression bei Argininmangel (z.B. nach t=24 h bei Antikörper-basierter Stimulation: Reduktion um $90,5 \pm 5,4\%$; $p=0.0012$) – auch bei den Zytokinen TNF- β und IL-10 eine ausgeprägte Suppression der Synthese bei Fehlen der Aminosäure Arginin (Abb. 3.9A). Die Inhibition ist dabei sowohl bei antikörper-basierter wie auch bei APZ-basierter T-Zell-Stimulation sowohl früh (24 h) wie auch spät (nach 96 h) gleichermaßen messbar (z.B. bei IL-10 bei Stimulation mit SEB-beladenen B-Zellen, t=24 h: Reduktion um $92,1 \pm 7,4\%$; $p<0.0021$; t=96 h: Reduktion um $95,1 \pm 4,9\%$; $p=0.0009$) (Abb. 3.9A). Im Gegensatz hierzu zeigte sich für die Zytokine IL-2, IL-6 und IL-8 eine gleichartige, durch Fehlen von Arginin im Wesentlichen unbeeinträchtigte Sekretion in den Zellkulturüberstand (z.B. bei IL-2, antikörper-basierter Stimulation, t=96 h: $106,6 \pm 38,6\%$ des Wertes bei Argininanwesenheit) (Abb.3.9C). Für TNF- α fand sich lediglich eine partielle Suppression zum späten Zeitpunkt bei antikörper-basierter Stimulation (Reduktion um $54,3 \pm 35,7\%$ bei Stimulation mit anti-CD3/-CD28), so dass hier die Zuteilung zu einer der beiden vorigen Zytokin-Gruppen (Suppression / Keine Suppression) nicht ganz klar ist (Abb. 3.9B).

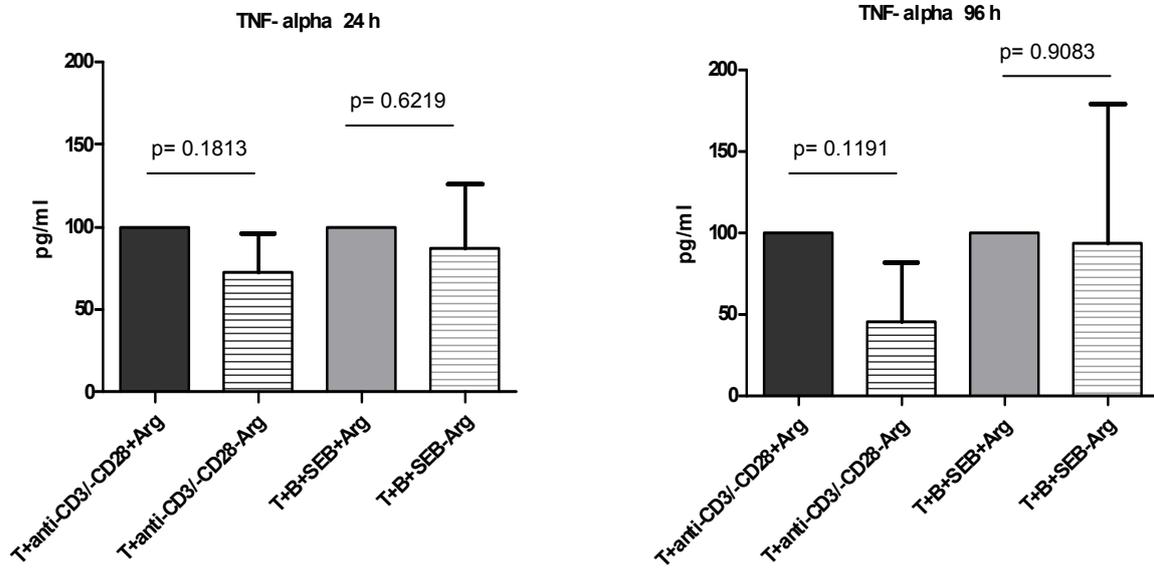
Die Zytokine IL-4, IL-5, IL-1 β und IL-12p70 wurden von den T-Zellen reproduzierbar bei unseren Aktivierungsbedingungen nicht sezerniert (Tab.3 im Anhang).

A.

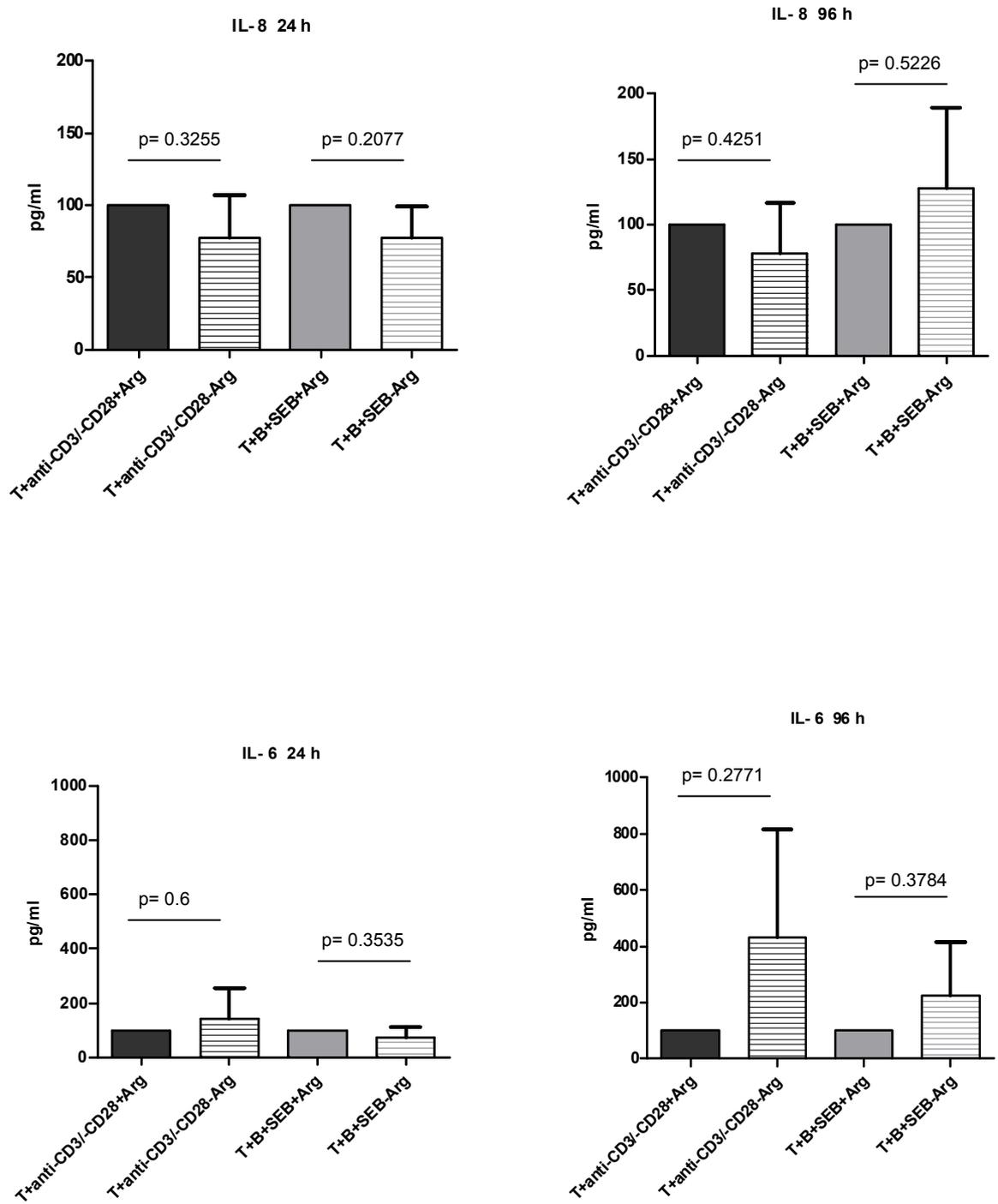




B.



C.



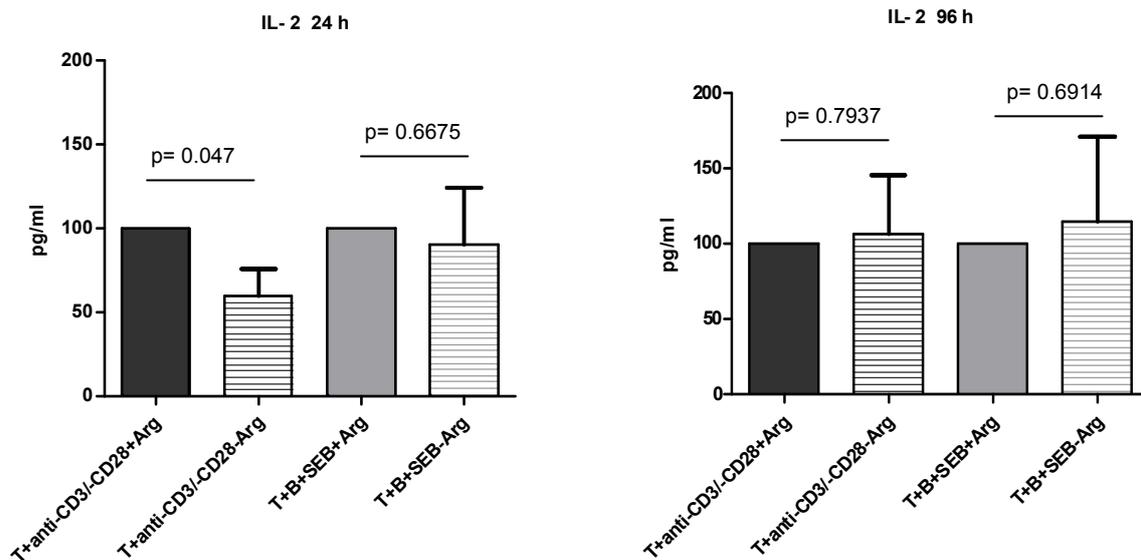


Abb.3.9: Multiplex-Zytokinmessung mittels Durchflusszytometrie. Humane T-Zellen wurden 24 h oder 96 h in argininhaltigem (+Arg) oder argininfreiem Medium (-Arg) mit anti-CD3/-CD28 (T+anti-CD3/-CD28) oder mit SEB Superantigen-beladenen B-Zellen (T+B+SEB) stimuliert und die Zytokine im Überstand mittels Multiplex Analyse im Durchflusszytometer gemessen. **A. und B.** Statistische Auswertung unter Anwendung des gepaarten Student's t-Test. Es werden jeweils die Mittelwerte +/- Standardabweichung (als Balken mit Fehlerbalken dargestellt) von insgesamt drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Bei TNF- β wurden für den Zeitpunkt 24 h nur zwei Experimente durchgeführt, so dass keine Berechnung der Signifikanz erfolgte.

3.10 Untersuchung der frühen Signaltransduktion in humanen T-Zellen in Abhängigkeit von Arginin

In T-Zellen werden zahlreiche Signaltransduktionsprozesse unmittelbar nach Aktivierung des TZR +/- Kostimulation aktiviert. Dies geschieht initial über die Phosphorylierung der CD3- ζ -Kette des TZR-Komplex, die Bindung und Aktivierung der Tyrosinkinase ZAP-70 und die Phosphorylierung von Adaptorproteinen wie SLP-76 und LAT. Die folgende Aktivierung der PLC- γ führt zur Produktion der wichtigen Signalmoleküle IP₃ und DAG. IP₃ aktiviert wiederum den Kalziumsignalweg und DAG ist an der Aktivierung der PKC- θ und des kleinen G-Proteins Ras beteiligt. Letztendlich führen alle Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B und AP-1, die zusammen u.a. die Transkription des IL-2-Gens initiieren, welches für die Proliferation der T-Zellen essentiell ist (Smith-Garvin et al. 2009).

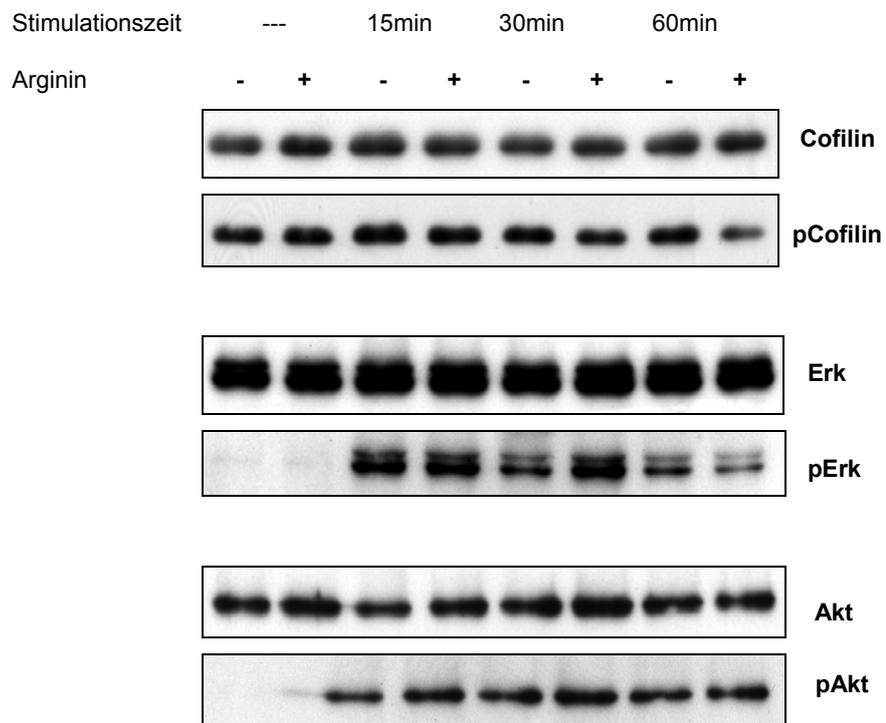
3.10.1 Arginin-unabhängige Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt bzw. Dephosphorylierung von Cofilin bei Kurzzeitstimulation humaner T-Zellen

Die Aktivierung von Cofilin via Dephosphorylierung über T-Zell-Kostimulation erfordert das Zusammenspiel zweier Signaltransduktionswege, die Ras-MEK-ERK- und Ras-PI3K-Signalkaskaden, vermittelt durch die GTPase Ras. Durch Aktivierung von Ras über PKC werden zwei Ras-Effektoren, MEK und PI3K via Phosphorylierung aktiviert. PI3K phosphoryliert des Weiteren die Proteinkinase B (PKB)/Akt. Eine Inhibierung von ERK oder PI3K hat die fehlende, kostimulations-induzierte Dephosphorylierung von Cofilin zur Folge (Samstag and Nebl 2005, Wabnitz et al. 2006). Die Phosphorylierung von Akt spiegelt die Aktivität von PI3K wieder, während die Phosphorylierung von ERK1/2 ein Marker für die Aktivität der MAPK/ERK Kinase (MEK) ist.

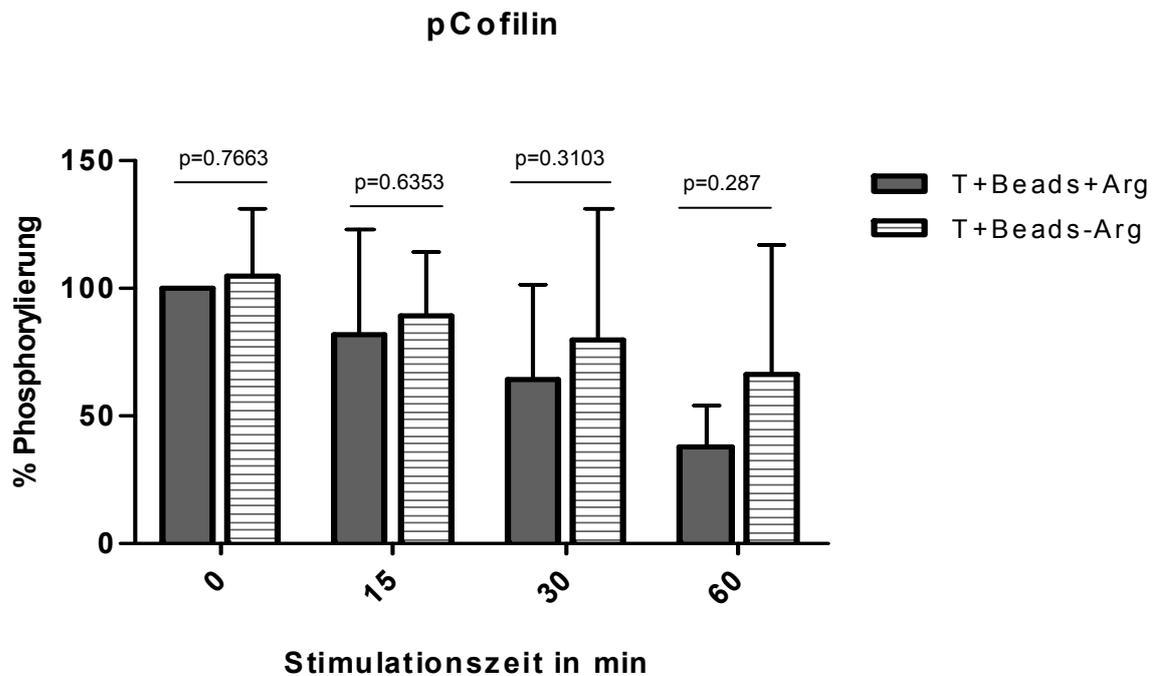
Zur Analyse der frühen Signaltransduktion via Akt und ERK1/2 bzw. der konsekutiven Dephosphorylierung von Cofilin wurden humane T-Zellen für 15 min, 30 min oder 60 min stimuliert. Nach Inkubation wurden die Zellen, die an anti-CD3/-CD28 gekoppelte Partikel gebunden hatten, über einen Magneten selektiert. Somit konnten spezifisch die T-Zellen untersucht werden, die bei diesen kurzen Stimulationszeiten tatsächlich aktiviert wurden. Die Expression der genannten Proteine sowie deren phosphorylierte Formen, wurde mittels Westernblot analysiert.

Die quantitative Auswertung der densitometrischen Analysen von insgesamt 3 verschiedenen Experimenten zeigte, dass ein Fehlen von Arginin keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung von Cofilin bis zum Zeitpunkt $t=30$ min bzw. die stimulationsabhängige Phosphorylierung (und damit Aktivierung) von ERK und Akt hat. Ferner zeigte sich bei Cofilin nach $t=60$ min eine tendenziell zunehmend verminderte Dephosphorylierung bei Argininabwesenheit ($t=15$ min: $p=0.6353$; $t=30$ min: $p=0.3103$ und $t=60$ min: $p=0.287$; jeweils Vergleich der Dephosphorylierung in An- und Abwesenheit von Arginin) (Abb. 3.10.1B). Ein repräsentatives Experiment ist in Abb 3.10.1A dargestellt, eine zusammenfassende Darstellung der densitometrischen Messungen ist in Abb.3.10.1B aufgeführt.

A.



B.



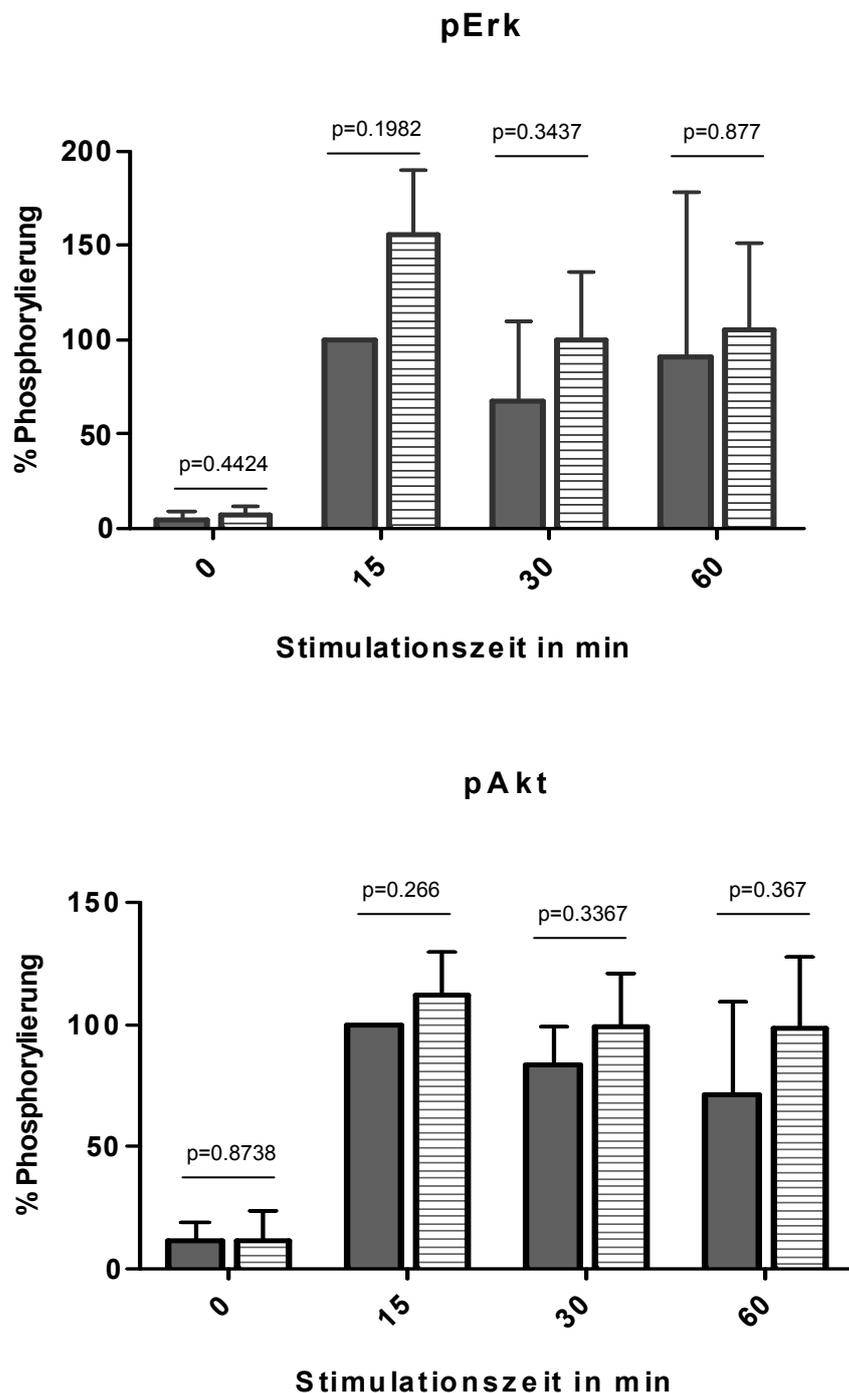


Abb.3.10.1: Westernblotanalyse der Proteine pCofilin, pErk und pAkt bei Kurzzeitstimulation von humanen T-Zellen. Humane T-Zellen wurden für 15 min, 30 min oder 60 min in argininfreiem (T+ anti-CD3/-CD28+Arg = graue Balken) oder argininhaltigem (T+ anti-CD3/-CD28-Arg = Balken mit Muster) Medium mit anti-CD3/-CD28 stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte T-Zellen (t=0h) in beiden Medien ÜN präinkubiert. **A.** Western Blot-Bilder eines repräsentativen Experiments von insgesamt drei unabhängigen Experimenten. **B.** Quantitative Auswertung der Expressionsstärke der einzelnen Western Blot Banden nach densitometrischer Analyse. Gezeigt werden die Werte von 3-4 unabhängigen Experimente mit Mittelwert +/- Standardabweichung (als Balken mit Fehlerbalken dargestellt).

3.10.2 Signaltransduktion über Kalzium bei Arginindefizienz

Eine weitere T-Zell-Signaltransduktionskaskade, die aktivierungsabhängige Zunahme des intrazellulären Calcium, wurde mit dem Calcium-Indikatorfarbstoff INDO-1 mittels Durchflusszytometrie (Kap. 2.2.5.3) untersucht. Hierzu wurden humane T-Zellen über Nacht in argininhaltigem oder argininfreiem Medium präinkubiert und am nächsten Tag mit dem Calcium-Indikatorfarbstoff INDO-1 gefärbt. Anschließend wurden die Antikörper anti-CD3 oder IgG2a (Isotypkontrolle) zu den Ansätzen gegeben. Während der Probenmessung wurde, zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach T-Zell-Aktivierung, ein kreuzvernetzender Antikörper (nach Messen des Grundlevels; 200 Sekunden) und als Positivkontrolle Ionomycin (nach Messen der Kalziumkonzentration nach Aktivierung; 400 Sekunden) zugegeben.

In drei voneinander unabhängigen Experimenten zeigten sich jeweils keine Unterschiede im Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration bei T-Zell-Stimulation in An- oder Abwesenheit von Arginin. (Abb.3.10.2).

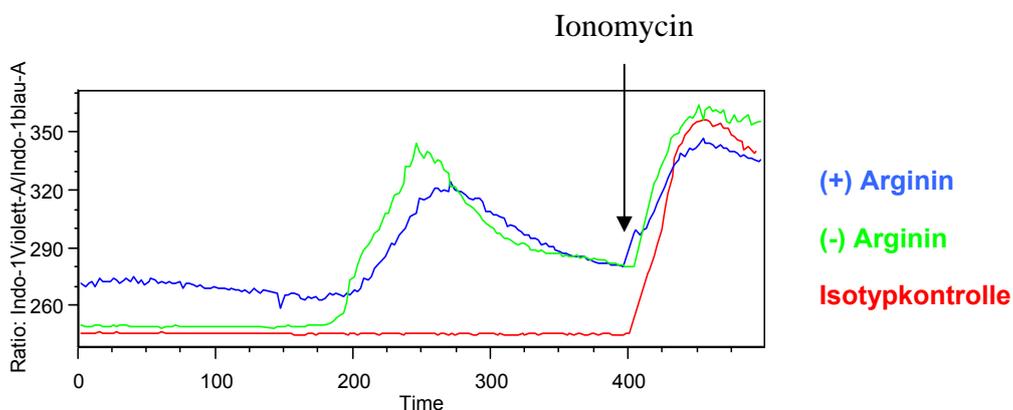


Abb.3.10.2: Calciumflussmessung mittels Durchflusszytometrie. Humane T-Zellen wurden über Nacht in argininhaltigem [(+)Arginin] oder argininfreiem [(-)Arginin] Medium präinkubiert und die Calciumkonzentration mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels der Software FlowJo. In der Grafik sind die Messergebnisse eines repräsentativen, von insgesamt drei unabhängigen, Experimenten als Overlay dargestellt. Der Zeitraum 0-200 Sekunden zeigt den Ruhepegel der Calciumkonzentration. Von 200 – 400 Sekunden wird die Calciumkonzentration nach Stimulation mit OKT3 angezeigt, wobei der kreuzvernetzende Antikörper direkt vor der Messung, zum Zeitpunkt t=200 Sekunden, hinzugegeben wurde. Ab 400 Sekunden kann der veränderte Gehalt von Kalzium nach Zugabe von Ionomycin (als Positivkontrolle zum Zeitpunkt t=400 Sekunden appliziert) beobachtet werden. Die in argininfreiem Medium stimulierten Zellen sind als grüne Linie, die in argininhaltigem als blaue Linie und die Isotypkontrolle als rote Linie dargestellt. Die Werte auf der Y-Achse geben das Verhältnis des Ca^{2+} -gebunden zum Ca^{2+} -ungebunden INDO-1-Farbstoff an. Je höher die Werte, desto mehr Ca^{2+} wurde gebunden, was wiederum mit der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration korreliert.

3.11 Regulation von Cofilin, ERK und Akt bei Arginindepletion durch PMN-Arginase aus humanem Eiter

Abschließend sollte die Regulation des Proteins Cofilin in einer Zellkulturbedingung analysiert werden, welche die physiologische Situation einer granulozytär dominierten Inflammation mit Freisetzung der Arginase I aus humanen PMN und konsekutiver Verstoffwechslung von Arginin abbildet. Hierfür wurde zellfreier Überstand aus humanem Eiter (gewonnen aus Abszesspunktaten chirurgischer Patienten, siehe Munder et al. 2006) gewonnen, die Arginase-Aktivität bestimmt und Zellkulturmedium mit einem Aliquot dieses zellfreien Eiterüberstands (finale Arginase-Aktivität: 300 mU/ml) für 24 h inkubiert. In einem Parallelansatz wurde zusätzlich der Arginaseinhibitor nor-NOHA hinzugegeben, um die Verstoffwechslung von Arginin durch PMN-Arginase zu unterbinden. Als Positivkontrolle dienten Kultivierungsansätze mit argininhaltigem Medium, als Negativkontrolle wurden T-Zellen in argininfreiem Medium aktiviert. T-Zellen wurden für 48 h in den verschiedenen Medien mit anti-CD3/-CD28 stimuliert. Zu jedem Experiment wurde parallel die T-Zell-Proliferation in allen verwendeten Medien mittels [³H]-Thymidinassay gemessen, wobei früher publizierte Daten aktuell verifiziert wurden (Munder et al. 2006). In der dargestellten repräsentativen Proliferationsmessung in Abb. 3.11.1 ist deutlich zu erkennen, dass T-Zellen, die in präinkubiertem argininhaltigem Medium mit humanem Eiterüberstand stimuliert wurden, einen kompletten Proliferationsverlust zeigen, entsprechend dem bei Argininabwesenheit (+Eiterüberstand: 60 ± 12 cpm; -Arg: 60 ± 15 cpm). Dieser Verlust wird jedoch bei Zugabe des Arginaseinhibitors nor-NOHA vollständig rekonstituiert (68929 ± 1121 cpm), vergleichbar der Proliferation in argininhaltigem Medium (48921 ± 2182 cpm).

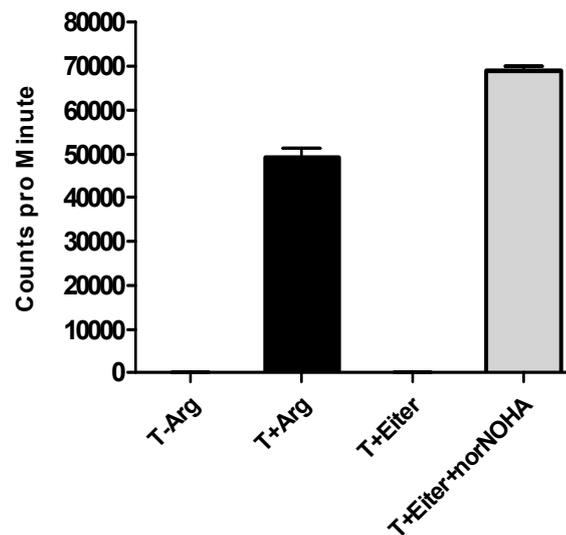


Abb. 3.11.1: Vollständige Hemmung der Proliferation durch Zugabe von humanem Eiterüberstand: Proliferationsmessung humaner T-Zellen mittels ^3H -Thymidin-Assay. Humane T-Zellen wurden für 48 h in argininfreiem (-Arg), argininhaltigem (+Arg; schwarzer Balken), mit humanem zellfreiem Eiterüberstand (+Eiter) und nor-NOHA (+Eiter, +nor-NOHA; grauer Balken) präinkubierten argininhaltigem Medium mit anti-CD3/-CD28 stimuliert. Grafisch dargestellt ist die Auswertung (Mittelwert \pm SD) eines repräsentativen Experiments (Gesamtzahl: drei).

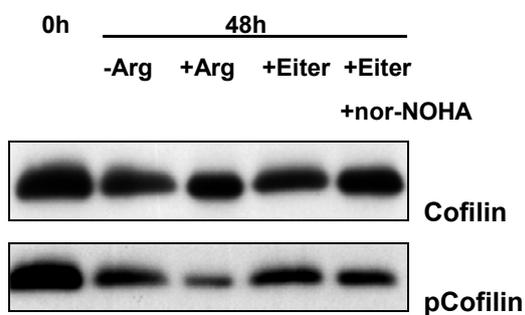
In parallelen Ansätzen wurden die T-Zellen geerntet, lysiert und die Expression von Cofilin, phospho-Cofilin sowie die aktivierungsabhängige Phosphorylierung von ERK und Akt mittels Western Blot untersucht.

Die Quantifizierung der densitometrischen Analysen von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten zeigte eine reduzierte Dephosphorylierung von Cofilin bei Abwesenheit von Arginin (Reduktion der Phosphorylierung um $42 \pm 12,5\%$ im Vergleich zu $77,5 \pm 17,1\%$ bei Stimulation in argininhaltigem Medium) sowie gleichermaßen bei Eiter-induzierter Arginindepletion (Reduktion der Phosphorylierung um $36,8 \pm 22,2\%$ im Vergleich zu $62,6 \pm 29,4\%$ bei Zugabe des Arginase-Inhibitors nor-NOHA), in Relation gesetzt zu der maximalen Phosphorylierung bei unstimulierten T-Zellen ($t=0$ h). Ein repräsentatives Einzelexperiment wird in Abb. 3.11A, und die quantitative Auswertung aller Experimente ist in Abb. 3.11B gezeigt).

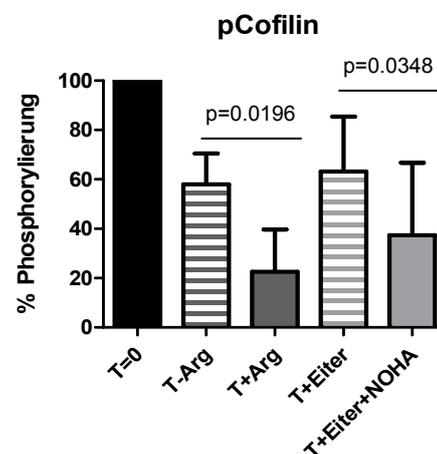
Interessanterweise wird die aktivierungs-induzierte Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in Abhängigkeit von Arginindepletion gegenläufig reguliert. Während ERK1/2 bei Anwesenheit von Arginin sowie bei T-Zell-Stimulation in mit zellfreiem Eiterüberstand und

nor-NOHA präinkubiertem argininhaltigen Medium, aktivierungs-abhängig phosphoryliert wird, ist die Phosphorylierung bei Arginindefizienz sowie bei Arginindepletion durch zellfreien Eiterüberstand gleichermaßen reduziert (Reduktion um $76,9 \pm 18,8$ % in (-)Arginin-Medium im Vergleich zu (+)Arginin-Medium; Reduktion um $89,3 \pm 2,1$ % bei Zugabe von zellfreiem Eiterüberstand im Vergleich zu präinkubiertem Medium mit Eiterüberstand + norNOHA). Im Gegensatz hierzu ist eine reduzierte Phosphorylierung von Akt bei Anwesenheit von Arginin zu beobachten (Reduktion um $49,3 \pm 30,2$ % in (+)Arginin-Medium im Vergleich zu (-)Arginin-Medium; Reduktion um $64,1 \pm 18,8$ % bei Zugabe von Eiterüberstand + nor-NOHA im Vergleich zu präinkubiertem Medium mit zellfreiem Eiterüberstand). In Abb. 3.11A ist jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten gezeigt, Abb.3.11B zeigt die quantitative Auswertung aller Experimente.

A.



B.



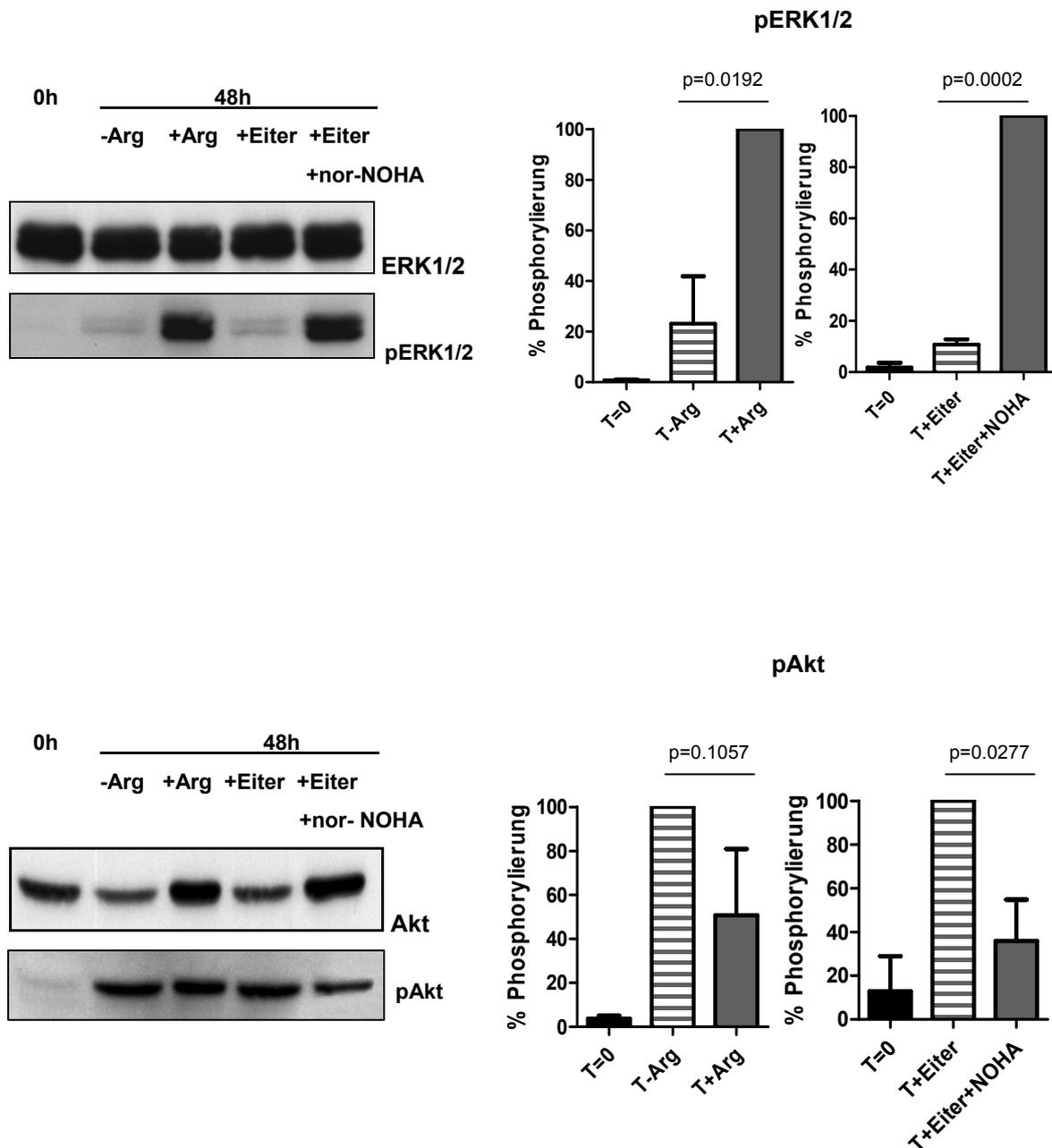


Abb.3.11: Arginindepletion durch Arginase I aus humanem Eiter: Analyse des Phosphorylierungsstatus der Proteine Cofilin, Akt und Erk in aktivierten humanen T-Zellen. Humane T-Zellen wurden für 48 h in argininhaltigem (+Arg), argininfreiem (-Arg), mit humanem zellfreien Eiterüberstand (+Eiter) und nor-NOHA (+Eiter, +nor-NOHA) präinkubierten argininhaltigem Medium stimuliert. **A.** Gezeigt werden Western Blot Bilder der Proteine Cofilin, pCofilin, Akt, pAkt, Erk und pErk eines repräsentativen Experiments von drei unabhängigen Durchführungen. **B.** Grafische Darstellung der densitometrischen Analyse der Phosphorylierung der jeweiligen Proteine. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden für pCofilin die Werte auf T=0 (=100%Phosphorylierung), bei pERK1/2 auf +Arg/ +Eiter+norNOHA (=100% Phosphorylierung) und für pAkt auf -Arg/ +Eiter (=100% Phosphorylierung) bezogen.

4 Diskussion

Die semiessentielle Aminosäure Arginin ist fundamental an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Arginin wird über zwei alternative Stoffwechselwege metabolisiert. Einerseits kann Arginin durch das Enzym Arginase zu Ornithin und Harnstoff hydrolysiert werden, wobei Polyamine und Prolin als Folgeprodukte entstehen, welche u.a. für die Geweberegeneration wichtig sind. Andererseits wird Arginin durch das Enzym NO-Synthase zu NO verstoffwechselt, welches eine anti-bakterielle Wirkung besitzt und zur Abwehr von Pathogenen dient (Bronte and Zanovello 2005). Die lokale Arginindepletion durch Arginase 1, freigesetzt von PMNs, führt in humanen T-Lymphozyten sowie NK-Zellen zur Hemmung wichtiger Effektorfunktionen wie Proliferation und Zytokinsynthese und verhindert somit eine korrekte T-Zell-Immunantwort (Munder et al. 2006). Diese Immunsuppression durch Arginindepletion konnte auch unter physiologischen (Kropf et al. 2007) und pathologischen Bedingungen (Rodriguez et al. 2005, Rodriguez et al. 2004, Zea et al. 2006) gezeigt werden. Während die Suppression des adaptiven Immunsystems phänotypisch mittlerweile recht gut charakterisiert ist, sind die Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion, die bei Arginindefizienz zu einer Suppression der T-Zell-Immunantwort führen, bislang im Wesentlichen unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels proteomischer Analyse zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung der T-Zell-Antwort durch Argininmangel mit einer Inhibition der Dephosphorylierung und damit Aktivierung des Aktin-bindenden Proteins Cofilin assoziiert ist.

4.1 Veränderung des Protein-Expressionsmusters aktivierter, humanen T-Lymphozyten bei Arginindefizienz

Die Herunterregulation der TZR- ζ -Kette wurde als ein potentieller Mechanismus beschrieben, welcher die T-Zell-Inhibition bei Argininmangel vermitteln könnte (Rodriguez 2002; siehe auch Abschnitt 1.10). Neben der bei Argininmangel in vitro nachgewiesenen Störung der nach Aktivierung normalerweise erfolgenden Reexpression von TZR ζ lassen sich auch in vivo bei Patienten mit Tumorerkrankungen, Autoimmunität und chronischer Inflammation regelhaft T-Lymphozyten nachweisen, welche durch einen partiellen Verlust der TZR- ζ -Kette charakterisiert sind (Baniyash 2004). Eine Reduktion der TZR- ζ -

Kettenexpression wurde bei zahlreichen Tumorentitäten auch in den NK-Zellen beobachtet (Baniyash 2004). Die verminderte Expression der TZR- ζ -Kette scheint jedoch ein Begleitphänomen zu sein, da die Proliferation aktivierter T-Lymphozyten bei Argininabwesenheit ebenso gehemmt ist, wenn die Stimulation anstelle über den TZR, über direkte, TZR-unabhängige intrazelluläre Freisetzung von Kalzium (durch Ionomycin) und Aktivierung der PKC (durch PMA) erfolgt (Munder et al. 2006). Ferner konnte gezeigt werden, dass die durch Arginindefizienz induzierte Beeinträchtigung der Zytokinsekretion aktivierter T-Zellen (Munder et al. 2006) sowie NK-Zellen (Oberlies et al. 2009) posttranskriptionell reguliert wird, da eine Quantifizierung der mRNA-Menge jeweils keine Unterschiede in Abhängigkeit von Arginin zeigte.

Einen phylogenetisch alten zellulären Reaktionsmechanismus auf Aminosäuremangel stellt die sogenannte „general control response“ dar. Mit Hilfe dieses Mechanismus zur Regulation der Translationsinitiation können Eukaryonten auf zellulären Stress wie Aminosäuredepletion reagieren, indem die zelluläre Protein-Synthese gehemmt und die Transkription von Genen der Aminosäure-Biosynthese verstärkt wird (Hinnebusch 1994). Bei murinen CD8⁺ T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass durch Tryptophandefizienz zu einer Phosphorylierung der GCN2K führt und dass diese Kinase die konsekutive Inhibition der T-Zell-Proliferation vermittelt. So konnten murine GCN2K-defiziente CD8⁺ T-Lymphozyten (isoliert aus einer GCN2K^{-/-} Maus) auch bei Fehlen von Tryptophan proliferieren, während Wildtyp-T-Zellen auf Tryptophanverarmung mit einem Zellzyklusarrest reagierten (Munn et al. 2005). Bei Argininmangel konnte in humanen polyklonalen T-Lymphozyten ebenfalls eine Phosphorylierung der GCN2K nachgewiesen werden, wobei der Nachweis einer kausale Beteiligung der Kinase im Rahmen der T-Zell-Inhibition im humanen System noch aussteht (Oberlies et al. 2009).

Vor diesem Hintergrund konnten in der vorliegenden Arbeit sieben Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden, die bei T-Zell-Aktivierung bei kompletter Arginindefizienz im Vergleich zur Aktivierung im Kontext physiologischer Arginkonzentration stärker exprimiert waren. Die Verifizierung dieser Ergebnisse in unabhängigen Experimenten mittels Westernblot unter Verwendung spezifischer Antikörper zeigte jedoch, dass nur eines dieser Proteine, die phosphorylierte inaktive Form des aktin-bindenden Proteins Cofilin, bei Argininabwesenheit signifikant stärker im Vergleich zur Aktivierung bei Anwesenheit von Arginin exprimiert wird. (vgl. 3.3).

Cofilin hat ein Molekulargewicht von 19 kDa und gehört zur ADF (engl. actin depolymerising factor)/Cofilin (engl. cofilamentous structure with actin)-Familie aktinbindender Proteine. Das in allen eukaryotischen Zelltypen ubiquitär exprimierte Protein, kommt in drei Formen vor: ADF, Cofilin-1 (Hauptform in Nicht-Muskel-Zellen) und Cofilin-2 (Hauptform in Muskelzellen) und ist essentiell für das Überleben der Zellen (Abe et al. 1996, Billadeau and Burkhardt 2006, Iida et al. 1993, Moon et al. 1993, Samstag et al. 1996, Vartiainen et al. 2002). Cofilin ist entscheidend für die Aktinpolymerisation und Depolymerisation und somit ein zentraler Regulator der dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Ferner ist die Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts eine entscheidende Komponente im Rahmen der T-Zell-Aktivierung (Billadeau et al. 2007, Burkhardt et al. 2008, Samstag et al. 2003). Cofilin ist als Schlüsselprotein der Aktin-Reorganisation folglich ein Hauptregulator der T-Zellaktivierung.

Wie in Kap.1.6 erwähnt, kann Cofilin *in vitro* an G- und F-Aktin binden, Aktinfilamente schneiden und depolymerisieren sowie eine verstärkte Polymerisation auslösen (Bamburg 1999, Condeelis 2001). In älteren Aktinfilamenten ist das ATP zu ADP hydrolysiert und diese werden damit für den Abbau durch Cofilin markiert, welches eine höhere Affinität zu ADP-Aktin-Monomeren besitzt (Carlier 1987, Pollard and Cooper 1986). Weiterhin führt eine Bindung von Cofilin an F-Aktin zu einer Veränderung der Aktinfilamentwindungen, was in einem vermehrten Schneiden der Filamente resultiert und die Bindung von Aktin an andere Proteine beeinflusst (McGough et al. 1997). Die Aktinbindefähigkeit von Cofilin, die bei T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielt (Eibert et al. 2004), wird durch Phosphorylierung am Serin3-Rest negativ reguliert, d.h. phospho-Cofilin ist die inaktive Form des Proteins (Moriyama et al. 1996). In untransformierten humanen T-Lymphozyten führt eine Blockierung der Cofilin-F-Aktin-Interaktion, mittels zellpermeabler homologer Peptide, zu einer gehemmten Proliferation und Zytokinproduktion (Eibert et al. 2004). Die Bindung von Cofilin an F-Aktin kann ausschließlich in aktivierten T-Zellen detektiert werden, da Cofilin in unstimulierten Zellen größtenteils phosphoryliert im Zytoplasma (Lee K. H. et al. 2000) oder an PIP2 gebunden an der PM (van Rheenen et al. 2009) vorliegt. Aufgrund dieser Erkenntnisse war zu vermuten, dass die bei Argininabwesenheit reduzierte Dephosphorylierung von Cofilin (vgl.3.3) und folgende Reduktion der Bindung von Cofilin an F-Aktin, zu einer Beeinträchtigung der T-Zell-Immunantwort führen würde.

4.2 Einfluss von Argininmangel auf das Aktin-Zytoskelett humaner T-Zellen nach APZ-basierter Stimulation

4.2.1 Beeinträchtigung der Ausbildung der IS durch Arginindefizienz

Die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts während der T-Zell-Aktivierung führt zu einer Polarisation der T-Zelle in Richtung der APZ, wobei sich im Kontaktbereich der Zellen die IS ausbildet, in der sich TZRs und Signalmoleküle anreichern. Die Ausbildung dieser Kontaktzone spielt eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-Aktivierung und der Differenzierung zu T-Effektorzellen (Delon and Germain 2000). In T-Zell-/B-Zellkonjugaten, die über Stimulation mit Superantigen induziert wurden, ist Cofilin in der peripheren Region der IS lokalisiert. Die Hemmung der Cofilin-F-Aktin-Interaktion *in vitro* führt zu einer verminderten Ausbildung der IS im Kontaktbereich zwischen humanen T-Zellen und APZ (Eibert et al. 2004).

Nachdem gezeigt wurde, dass die Dephosphorylierung des Proteins Cofilin-1 bei T-Zell-Aktivierung in Abwesenheit von Arginin ausbleibt, wurde die argininabhängige Ausbildung der IS zwischen T-Zelle und APZ untersucht. Hierfür wurde ein weiteres System zur Stimulierung der T-Zellen über Antigenpräsentierende SEB-beladene Raji B-Zellen etabliert. Es zeigte sich, dass die profunde Suppression der T-Zellfunktionen bei Argininmangel auch im APZ-basierten System feststellbar ist (vgl.3.4) und dieses somit für weitere Analysen validiert zur Verfügung stand.

Die Analyse der Ausbildung einer IS im Kontaktbereich von T-Zelle und antigenpräsentierender B-Zelle in Abhängigkeit von Arginin ergab, dass bei Arginindefizienz ein signifikant geringerer Anteil an T-Zell-/B-Zellkontakten gebildet wird. Des Weiteren wurden innerhalb der ausgebildeten Kontaktzonen zwischen T- und B-Zellen eine verminderte Akkumulation von CD3- und CD2-Rezeptoren gemessen (vgl. 3.5), die ein Merkmal für die Ausbildung der IS sind. Diese Ergebnisse zeigten, dass die fehlende Dephosphorylierung von Cofilin bei Argininmangel mit einer reduzierten Ausbildung der Kontaktzone zwischen T-Zellen und APZs assoziiert ist und korrelieren mit den publizierten Daten, die zeigten, dass die IS bei Blockierung der Cofilin-/F-Aktin-Interaktion vermindert ausgebildet wird (Eibert et al. 2004).

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der stark reduzierten Dephosphorylierung von Cofilin wurde der intrazelluläre F-Aktin Gehalt der T-Zellen gemessen. Die Analysen

zeigten, dass die F-Aktinmenge humaner T-Zellen ausschließlich nach 48h argininabhängig und stimulationsabhängig reguliert wird. In T-Lymphozyten, die antikörper-basiert stimuliert wurden, wurde bei Argininmangel eine signifikant geringere Konzentration an F-Aktin gemessen, während bei APZ-basierter Stimulation bei Argininabwesenheit mehr F-Aktin in den T-Zellen akkumulierte (vgl. 3.6). Es bleibt zu klären, welche unterschiedlichen intrazellulären Vorgänge diese stimulationsabhängige F-Aktin-Regulation bedingen. Klar ist jedoch, dass sich der F-Aktin Gehalt bei T-Zell-Aktivierung in argininfreier Umgebung nach 48h Stimulation signifikant verändert und der Argininmangel somit den Aktin-Kreislauf beeinflusst. Dieser Phänotyp korrelierte mit der reduzierten Cofilin-Dephosphorylierung und war der reduzierten Ausbildung der IS zeitlich nachgeschaltet.

4.2.2 Keine Beeinträchtigung der Migration humaner T-Lymphozyten in Abhängigkeit von Arginin

Ein weiterer Prozess, der bei T-Zell-Aktivierung eine entscheidende Rolle spielt, ist die Migration der T-Lymphozyten durch das Endothel der Blutgefäßwand in periphere Gewebe (z.B. an einen Infektionsort). Auch hierbei findet eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts statt, an welcher der dynamische F-Aktinkreislauf beteiligt ist (Samstag et al. 2003). Für diesen Migrationsprozess ist die Schneideaktivität von Cofilin erforderlich, um die Richtung der Membranausstülpungen und dadurch die Wanderrichtung der Zelle zu bestimmen, indem die Bildung freier Plus-Enden, die für die Aktinpolymerisation benötigt werden, initiiert wird (Ghosh et al. 2004, Mouneimne et al. 2006, Sidani et al. 2007). In invasiven Subpopulationen von Tumorzellen aus Brusttumoren ist die Expression von Cofilin und anderen Proteinen des Cofilin-Signalwegs, wie z.B. LIMK, hochreguliert (Wang J. et al. 2004) und der Aktivierungsstatus von Cofilin ist direkt verbunden mit Invasion, Intravasation und Metastasierung (Wang W. et al. 2006). Die Hemmung der Cofilinaktivität in Karzinomzellen mittels siRNA (Hotulainen et al. 2005) oder Expression der konstitutiv aktiven LIMK-Domäne (Zebda et al. 2000) inhibiert die Zellmotilität. Eine Suppression der Cofilinexpression mittels siRNA reduziert die Invasion der Karzinomzellen durch verminderte Ausbildung und Stabilität von Invadopodien (Yamaguchi et al. 2005).

Bei Analyse der Migrationsfähigkeit der T-Zellen bei Aktivierung über das Chemokin SDF-1 α in Ab- und Anwesenheit von Arginin, konnten keine Unterschiede festgestellt werden (vgl. 3.7). Dieser komplexe Prozess der Zellmotilität ist demnach unabhängig von Arginin

und sollte es humanen T-Lymphozyten erlauben, auch bei inflammationsassoziiertes Arginindepletion in vivo prinzipiell chemotaktischen Gradienten folgend zu migrieren. Diese Daten kontrastieren mit der supprimierten chemotaktischen Motilität primärer humaner T-Lymphozyten bei Cofilin-Defekt im Rahmen von oxidativem Stress (Klemke et al. 2008).

4.3 Einfluss von Arginin auf die Zytokinsynthese und -sekretion humaner T-Zellen

Die Zytokinsekretion und -synthese sind weitere wichtige Effektorfunktionen von T-Lymphozyten, die für eine vollständige Immunantwort erforderlich sind. Nach Aktivierung sezernieren T-Zellen u.a. die wichtigen Zytokine IL-2 und INF- γ . IL-2 ist wesentlich für die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen, und wirkt als auto- und parakriner Wachstumsfaktor, indem der aktivierungs-abhängig hochregulierte, hochaffine IL-2-Rezeptor auf den T-Zellen das Zytokin detektiert. INF- γ dagegen beeinflusst v.a. die Differenzierung von T-Lymphozyten. In PBMC von Patienten mit Nierenzellkarzinom konnte einhergehend mit einer erhöhten Arginase-Aktivität bzw. Arginindepletion u.a. eine verminderte Produktion von IL-2 und INF- γ beobachtet (Zea et al. 2005) werden. Ferner führt das Fehlen von Arginin bei primären humanen T-Lymphozyten (Munder et al. 2006) und NK-Zellen (Oberlies et al. 2009) zur Suppression der INF- γ -Synthese. Da die Transkription der INF- γ -mRNA jedoch unabhängig von der Argininkonzentration ist, scheint dieser Suppression eine posttranskriptionelle Inhibierung zugrunde zu liegen (Munder et al. 2006, Oberlies et al. 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von INF- γ beeinträchtigt ist, wenn die Bindefähigkeit von Cofilin an F-Aktin blockiert wird (Eibert et al. 2004).

4.3.1 Unterschiedliche Regulation der Zytokinsekretion

Bei der Analyse der Zytokinsekretion im Zellkulturüberstand für verschiedene Stimulationszeiten von 6h bis 96h und Antikörper- sowie APZ-basierter Stimulation, konnte für IL-2 und INF- γ eine dichotome Regulation beobachtet werden. Während IL-2 bei Argininmangel initial in signifikant geringerer Konzentration im Überstand, bei beiden Stimulationsarten, nachgewiesen werden konnte, war dieser Unterschied in Abhängigkeit von Arginin nach längerer Stimulation nicht mehr nachweisbar (vgl. 3.8.1). Es liegt demnach kein Sekretionsdefekt vor, sondern lediglich eine Verzögerung. Diese

protrahierte Sezernierung von IL-2 ist demnach auf den Argininmangel zurückzuführen und könnte dadurch einzig zu einer verzögerte T-Zell-Immunantwort führen.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei Argininabwesenheit an allen Messzeitpunkten eine stark verminderte IFN- γ -Konzentration im Zellkulturüberstand (vgl. 3.8.1). Diese beobachtete Suppression der INF- γ -Sekretion verifiziert ferner die Daten früherer Untersuchungen, bei denen humanen T-Zellen in Abhängigkeit von Arginin für 48h mit plattengebundenen CD3-Antikörper (OKT3) stimuliert wurden (Munder et al. 2006).

Aufgrund der beobachteten zytokinspezifischen Regulationsmechanismen bei Arginindefizienz, interessierten wir uns diesbezüglich für weitere pro- und anti-inflammatorische Zytokine. Die parallele Analyse zahlreicher Zytokine im Zellkulturüberstand bei kürzerer (24h) und längerer (96h) Stimulationsdauer sowie bei antikörper- und APZ-basierter Stimulation ergab im Rahmen dieser Promotionsarbeit erstmals, dass die T-Zell-Zytokine prinzipiell in zwei Klassen eingeteilt werden können: die argininabhängigen (IFN- γ , TNF- β , IL-10) sowie die argininunabhängigen (IL-2, IL-6, IL-8). Es bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, welche intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen diese unterschiedliche Sensitivität der Zytokine gegenüber extrazellulärer Arginindepletion bewirken. Offenbar handelt es sich hierbei allerdings nicht um eine funktionelle Dichotomie hinsichtlich Inflammation / Anti-Inflammation. So werden z.B. das prototypische inflammatorische Zytokin IFN- γ sowie das klassische anti-inflammatorische Zytokin IL-10 gleichartig argininabhängig reguliert.

Die durchflusszytometrischen Analysen zur intrazellulären Zytokin-Akkumulation zeigten ferner, dass es sich beim Defekt der Zytokinsynthese nicht um eine Sekretionsstörung mit intrazellulärer Akkumulation handelt, sondern in Zusammenschau mit den publizierten Untersuchungen zur mRNA Expression (Munder et al. 2006) eine posttranskriptionelle Synthesestörung vorliegt.

4.4 Kein Einfluss von Arginin auf frühe Signaltransduktionsereignisse in primären humanen T-Lymphozyten

Intrazellulärer Calciumflux ist ein frühes Ereignis der T-Zell-Aktivierung. Bei TZR-vermittelter Stimulation von T-Lymphozyten kommt es zu einer Aktivierung der PLC- γ mit konsekutiver hydrolytischer Spaltung von PIP₂ in IP₃. Die Bindung von IP₃ an IP₃-Rezeptoren auf Ca²⁺-durchlässigen Ionenkanälen der Membran des endoplasmatischen

Retikulum (ER) führt zu einer Freisetzung des Ca^{2+} aus dem ER-Speicher in das Zytoplasma sowie einem sekundären Einstrom von extrazellulärem Calcium über Calcium-abhängige Calcium-Kanäle der Zellmembran. Die Zunahme von zytoplasmatischem Ca^{2+} führt letztendlich via Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT zur Expression verschiedener Gene (z.B. IL-2) und reguliert dadurch die Differenzierung, Proliferation und Effektorfunktionen der T-Zellen (Oh-hora and Rao 2008, Smith-Garvin et al. 2009). In T-Lymphozyten von Patienten mit Immundefizienz-Syndrom (SCID, severe combined immune deficiency), zeigte sich ein funktioneller Defekt der Kalziumkanäle, dem Ca^{2+} -Influx, und folgend der Aktivierung von NFAT, welches zu einer signifikanten Reduktion Calcium-abhängiger Gene führt und schließlich zu einer supprimierten Immunantwort (Oh-hora and Rao 2008, Savignac et al. 2007). Ferner induziert Ca^{2+} über Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, welche wiederum die Phosphatase SSH1L aktiviert, die Dephosphorylierung von Cofilin (Wang Y. et al. 2005). Folglich könnte ein Defekt in der Ca^{2+} -vermittelten Signalkaskade zu einer fehlenden Dephosphorylierung von Cofilin, assoziiert mit einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung, führen. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Messungen des aktivierungsabhängigen Calciumfluxes in humanen T-Lymphozyten zeigten, dass dieser argininunabhängig verläuft (vgl. 3.10). Somit ergaben sich keine Anhaltspunkte dafür, dass der Calcium-abhängige Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionsweg durch Argininabwesenheit beeinflusst wird.

Weitere für die initiale T-Zell-Aktivierung entscheidende Signaltransduktionswege, die Ras-MEK-ERK- und Ras-PI3K-Akt-Signalkaskaden, werden durch die GTPase Ras vermittelt. Die Stimulation über den TZR-Komplex und kostimulatorische Moleküle (wie z.B. CD2, CD28) führt durch Aktivierung von Ras über PKC via Phosphorylierung der Ras-Effektoren MEK und PI3K zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche über Expression essentieller Gene die T-Zell-Effektorantwort regulieren können. Das Zusammenspiel dieser beiden Signalwege ist für die kostimulations-induzierte Aktivierung von Cofilin erforderlich, da die Inhibierung von MEK oder PI3K eine fehlende Dephosphorylierung zur Folge hat (Samstag and Nebl 2005, Wabnitz et al. 2006). Aus den Western Blot Untersuchungen zur frühen Phosphorylierung (0-30 min nach Beginn der T-Zell-Stimulation) wurde klar, dass zumindest initial keine argininabhängigen Alterationen dieser wichtigen Kinase-Phosphorylierungen (und damit assoziiert deren Aktivierung) in humanen T-Zellen feststellbar sind. Diese Ergebnisse kontrastierten mit dem Phosphorylierungsstatus der aktivierten T-Zellen zu späteren Zeitpunkten. Die hier festgestellte fehlende ERK-Phosphorylierung bei Arginindefizienz bei persistierender Akt-Phosphorylierung bei Argininabwesenheit (und vice versa bei Anwesenheit von Arginin)

lässt sich potentiell mit einer fehlenden negativen Rückkopplung von dephosphoryliertem Cofilin auf die (die Dephosphorylierung unterhaltende) PIK3 Kinase-Aktivität erklären.

Die Regulation des Phosphorylierungszyklus von Cofilin ist sehr komplex und wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Da sich die fehlende Dephosphorylierung von Cofilin erst zu einem späteren Zeitpunkt während der T-Zell-Aktivierung entwickelt (vgl. 3.3 und 3.11), sind möglicherweise zeitverzögert Alterationen der Aktivität der Serin-Kinasen LIMK 1 und 2 (engl. LIM motif containing protein kinases) (Arber et al. 1998, Yang et al. 1998) in welche Cofilin via Phosphorylierung inaktivieren können (Arber et al. 1998, Yang et al. 1998), in diesen Prozess mit involviert. Auch eine Inhibierung der Cofilin-dephosphorylierenden T-Zell-Phosphatasen PP1 oder PP2A (Ambach et al. 2000) könnte eine verminderte Aktivität von Cofilin im weiteren Verlauf der T-Zell-Aktivierung zur Folge haben. Hier sind zusätzliche detaillierte Untersuchungen zur T-Zell-Signaltransduktion bei Arginin-Defizienz sicher interessant und zielführend.

Ferner kann die Aktivität von Cofilin nach Dephosphorylierung durch PIP_2 inhibiert werden. Die Bindung von PIP_2 blockiert die Aktin-Bindungsstelle von Cofilin. Im aktiven Zustand befindet sich Cofilin u.a. auch im Bereich der Plasmamembran (PM), wobei das Protein dort an PIP_2 gebunden und inaktiviert wird. Wird PIP_2 durch $PCL\gamma$ hydrolysiert, wird Cofilin lokal im Bereich der PM wieder in seiner aktiven Form freigesetzt und diffundiert von der PM ins Zytosol. Ein Teil dieses Cofilin wird jedoch nachfolgend durch LIMK via Phosphorylierung erneut inaktiviert (van Rheenen et al. 2009). Zwar konnten wir initial keine Alterationen des $PLC\gamma$ -abhängigen Calciumfluxes messen, dies schließt natürlich nicht eine Alteration des Phosphatidylinositol-Metabolismus im weiteren Verlauf der T-Zell-Aktivierung aus. Ein weiterer Mechanismus, durch den die Cofilin-Aktivität kontrolliert wird ist die Änderung des intrazellulären pH-Wertes. Bei einem pH-Wert über 8 wirkt Cofilin stärker depolymerisierend als bei einem niedrigeren pH-Wert (Yonezawa et al. 1985). Zusätzlich ist auch die Konzentration von Cofilin in der Zelle entscheidend für eine Polymerisation oder Depolymerisation von F-Aktin. Sind Aktinfilamente nur mit wenig Cofilinmolekülen bedeckt, ist die Schneideaktivität hoch, binden viele Moleküle an Aktin, so ist diese Aktivität nicht mehr messbar (Andrianantoandro and Pollard 2006, Van Troys et al. 2008). Für die im pathophysiologischen Kontext von oxidativem Stress auftretende T-Zell-Suppression ist kürzlich ebenfalls eine Inaktivierung von Cofilin beschrieben worden (Klemke et al. 2008). Hierbei fand sich bei erhaltener Cofilin-Dephosphorylierung eine intramolekulare Disulfidbrückenbindung, welche dazu führte, dass trotz Bindung von

Cofilin an F-Aktin keine Depolymerisierung des F-Aktins induziert werden konnte (Klemke et al. 2008).

4.5 Inhibition der Cofilin-Dephosphorylierung bei granulozytärer Inflammation.

Das Enzym Arginase kann bei Patienten mit chronischen Entzündungen (z.B. Asthma) (Zimmermann and Rothenberg 2006), mit Infektionskrankheiten (z.B. mit *Helicobacter pylori* oder *Bacillus anthracis*) (Raines et al. 2006, Zabaleta et al. 2004) und bei Tumorpatienten (z.B. Magen- und Lungenkarzinom) (Rodriguez et al. 2004, Wu et al. 1994) in erhöhten Mengen gemessen werden. Des Weiteren konnten auch in humanem Abszesseiter bzw. zellfreiem Eiterüberstand chirurgischer Patienten sehr hohe Arginase-Aktivitäten nachgewiesen werden (Munder et al. 2006). Da Eiterbildung den Prototyp einer granulozytär-dominierten Entzündung darstellt, sind als Quelle der nachgewiesenen Arginase I im Eiter am ehesten die zerfallenen neutrophilen Granulozyten anzunehmen (Munder et al. 2006). T-Zellen, die in Zellkulturmedium stimuliert wurden, das mit zellfreiem Eiterüberstand präinkubiert wurde, waren in ihrer Proliferation und Zytokinsekretion ebenso supprimiert wie T-Lymphozyten, die in argininfreiem Medium stimuliert wurden. Die kausale Rolle der Arginase im Eiter zeigte sich dadurch, dass durch die Zugabe des Arginase-Inhibitors nor-NOHA die gehemmte Proliferation der T-Lymphozyten wieder hergestellt werden konnte (vgl. 3.11) (Munder et al. 2006).

Um die Regulation des Proteins Cofilin unter der pathophysiologischen Bedingung einer granulozytär dominierten Inflammation in Zellkultur zu untersuchen, wurden T-Zellen für 48 h in argininhaltigem Medium inkubiert, dem zuvor humaner zellfreier Eiterüberstand zugefügt wurde. Es zeigte sich dabei, dass die fehlende Dephosphorylierung von Cofilin auch bei T-Zell-Aktivierung im Kontext Eiter-induzierter Arginindepletion feststellbar ist. Die kausale Rolle der Arginase zeigte sich hier erneut durch Reversibilität von T-Zell Proliferation und Cofilin-Dephosphorylierung bei Zugabe des Arginase-Inhibitors nor-NOHA. Interessant sind sicher künftige Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von Cofilin in humanen T-Lymphozyten im Rahmen verschiedener inflammatorischer Zustände, bei Infektionserkrankungen und Tumoren. Hierbei sind bei bereits bekannter Argininverarmung Störungen der Cofilin-Dephosphorylierung sowie der nachgeschalteten zentralen T-Zell-Funktionen zu erwarten. Therapeutische Ansätze zur Inhibierung inflammationsassoziiertes Immunsuppression sollten sich daher neben der Inhibierung der

Arginase bzw. Supplementation von Arginin auch mit der Möglichkeit beschäftigen, die Dephosphorylierung des Proteins Cofilin pharmakologisch zu modulieren.

5 Anhang

5.1 Tabellen

A.

Experiment	T+Beads+Arg	T+Beads-Arg	T+B+SEB+Arg	T+B+SEB-Arg	T+B+Arg	T+B-Arg	T+Arg unstim.	T-Arg unstim.
6h								
29.10.2009	768,3	452	1348,6	512	0	0	0	0
14.10.2009	66,85	42,35	98,11	10	0	0	0	0
23.06.2008			3828	2054	58	0,5	490	276
30.06.2008			5260	2162	1	1	204	1
06.07.2008	7371	2828	5703	2690	1779	158	1458	2180
08.09.2008	1458	285	444	219	1	1	1	1
24h								
13.10.2009	111548	6447	9912,7	5873	0	0	0	
03.06.2009	16840	996	18030	8190	801	235		
13.05.2009	11580	4208	2650	1699	0	0	0	0
24.06.2008			13482	13101	664	299	0,5	0,5
01.07.2008			21303	15502	445	198	1	1
07.07.2008	13545	5906	9616	13128	456	96	102	72
09.09.2008	9888	2198	6408	3328	1	1	1	1
48h								
13.05.2009	31824	20468	8365	7708	204	72	72	55
08.07.2008	15448	8184	11470	16815	1044	496	0,5	0,05
02.07.2008			9966	8996	708	168	1	1
10.09.2008	9417	2286	7677	3894	594	1	1	1
04.02.2008	4238	2554	6946	6026	892	264	0	0
24.02.2008	10623	8694	10491	9186	1757	38	0	0
24.06.2008			5259	7635	614	1286	514	510
72h								
29.10.2009	7100	4100	12280	11200	1960	0		
05.02.2009	3346	2460	6946	6808	100	336	0	0
17.05.2009	3925	1917	1704	888	64	0	0	0
96h								
07.06.2009	4475	3877	6064	8240	514	0	0	0
08.02.2009	2220	2271	14582	10354	1208	1120	0	0
17.05.2009	10485	3344	5229	3404	176	48	20	0
04.10.2009	2272	3698	7541	11882	0	0	0	0

B.

Experiment	T+Beads+Arg	T+Beads-Arg	T+B+SEB+Arg	T+B+SEB-Arg	T+B+Arg	T+B-Arg	T+Arg unstim.	T-Arg unstim.
6h								
12.05.2005	81,3	40	1056	918	280	0	104	0
27.05.2004	375	150	486	360	44,7	0	0	105
05.05.2004	5092,74	2764,74	2793	1031	1925	333	2664	2759
21.04.2004	1230	2213	342	174	1229	98	1072	2020
24h								
08.07.2005	3290	368	5590	1278	1209	0	0	0
13.05.2005	1834	120	2226	357	640	42,6	0	0
28.05.2004	2923	634	5606	3154	862	90	0	39
06.05.2004	5823	2138	4093	2568	1021	237	207	719
22.04.2004	1795	729	1371	713	815	158	296	9
48h								
14.05.2005	4632	1328	5696	2736	1668	69,8	32	37
24.02.2005	19638	3666	16794	5076	14244	682	0	0
04.02.2005	5047	212	17487	3826	3702	186	30	25
29.05.2004	4866	642			2473	729	0	0
07.05.2004	5179	918	12711	5803	3925	1395	53	166
23.04.2004	5970	752			1494	565	17	148
72h								
17.05.2005	3494	25	1205	168	135	15	0	0
06.02.2009	5338	0	51672	3027	4436	183	0	0
25.02.2005	11313	3228	12702	5109	9905	1116	0	0
96h								
29.07.2005	7404	715	9872	2216	2376	277	0	0
17.05.2005	4972	336	5976	1485	2858	193	88	95
02.03.2005	4152	846	2787	609	257	44	0	0
08.02.2005	3568	306	4956	720	933	12	12	0

Tab. zu 3.8: Originaldaten der IL-2 und IFN γ ELISA-Messungen nach Zeiten und Datum aufgelistet. Teilweise wurden Daten nicht in die Auswertung genommen, wenn die Proliferation der T-Zellen ungenügend oder völlig unterschiedlich waren (Lücken). Die Zeit ist in Stunden (h) angegeben. Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/CD28 (T+Beads) in argininhaltigem (+Arg) oder arginifreiem Medium (-Arg), Stimulation mit Superantigen beladenen B-Zellen (T+B+SEB); T-Zellen mit unbeladenen B-Zellen (T+B) und T-Zellen alleine (T unstim.) als Kontrollen. **A.** Zeigt die Originaldaten der IIL-2 ELISA-Messungen. **B.** Zeigt die Originaldaten der IFN γ ELISA-Messungen.

Experimente 24h	Argpos+Beads	Argneg+Beads	Argpos+SEB	Argneg+SEB	Experimente 96h	Argpos+Beads	Argneg+Beads	Argpos+SEB	Argneg+SEB
Zytokin: IL-6					Zytokin: IL-6				
blank 37,1					blank 37,1				
14.10.2009	206,3	500,0	750,0	303,9	19.10.2009	1267,2	1883,6	1698,3	1670,3
29.9.2009	357,8	295,3	655,2	743,5	02.10.2009	754,3	1967,7	750,0	959,1
15.07.2009	605,1	379,0	543,6	369,2	05.10.2009	137,3	909,5	178,4	663,8
blank 54,4									
Zytokin: IL-8					Zytokin: IL-8				
blank 114,9					blank 114,9				
14.10.2009	1007,4	1106,4	1883,0	1127,7	19.10.2009	3510,6	2946,8	3840,4	4031,9
29.9.2009	867,0	520,2	2010,6	2000,0	02.10.2009	2414,9	952,1	2819,1	2276,6
15.07.2009	1219,5	853,7	2097,6	1609,8	05.10.2009	853,2	952,1	748,9	1361,7
blank 56,3									
Zytokin: IL-10					Zytokin: IL-10				
blank 126,3					blank 126,3				
14.10.2009	130,3	118,5	152,4	125,3	19.10.2009	840,7	112,5	194,9	121,0
29.9.2009	1403,4	134,1	1762,7	364,4	02.10.2009	2847,5	230,5	1320,3	184,7
15.07.2009	1782,6	76,2	747,0	107,0	05.10.2009	1128,8	457,6	267,8	140,2
blank 42									
Zytokin: IL-12p70					Zytokin: IL-12p70				
blank 172,4					blank 172,4				
14.10.2009	132,2	154,3	202,0	162,7	19.10.2009	237,3	166,1		
29.9.2009	132,7	64,9	331,4	292,2	02.10.2009	235,3	164,1	290,2	203,9
15.07.2009	53,5	45,3	71,2	51,3	05.10.2009	142,4	116,3	172,5	189,4
blank 42,72									
Zytokin: TNFβ					Zytokin: TNFβ				
blank 61,7					blank 61,7				
14.10.2009	195,3	154,7	203,3	101,4	19.10.2009	2144,9	354,2	1500,0	197,7
29.9.2009	223,8	59,8	495,3	175,7	02.10.2009	1406,5	225,7	1635,5	273,4
					05.10.2009	700,9	331,8	1121,5	446,7
Zytokin: TNF-alpha					Zytokin: TNF-alpha				
blank 114,8					blank 114,8				
14.10.2009	2483,3	2083,3	2550,0	1618,3	19.10.2009	3700,0	885,0	268,3	198,3
29.9.2009	1653,3	823,3	2050,0	2666,7	02.10.2009	1866,7	621,7	543,3	263,3
15.07.2009	2470,6	2211,8	2270,6	1552,9	05.10.2009	1145,0	1008,3	276,7	425,0
blank 67,1									
Zytokin: IL-1beta					Zytokin: IL-1beta				
blank 75,9					blank 75,9				
14.10.2009	71,3	80,9	107,9	80,4	19.10.2009	75,6	65,4	164,3	85,6
29.9.2009	67,9	54,3	96,3	109,0	02.10.2009	84,1	82,4	94,4	97,9
15.07.2009	256,3	234,7	254,2	279,5	05.10.2009	81,9	76,4	101,9	65,0
blank 195,8									

Experimente 24h	Argpos+Beads	Argneg+Beads	Argpos+SEB	Argneg+SEB	Experimente 96h	Argpos+Beads	Argneg+Beads	Argpos+SEB	Argneg+SEB
Zytokin: IL-4					Zytokin: IL-4				
blank 442,7					blank 442,7				
14.10.2009	301,8	454,5	400,9	467,3	19.10.2009	450,0	477,3	576,4	369,1
29.9.2009	408,2	301,8	508,2	578,2	02.10.2009	490,9	519,1	610,0	407,3
15.07.2009	2085	1890	2030	2090	05.10.2009	379,1	391,8	408,2	440,0
blank 1570									
Zytokin: IL-5					Zytokin: IL-5				
blank 128					blank 128				
14.10.2009	120,0	135,9	96,1	115,9	19.10.2009	148,3	131,2	147,8	126,8
29.9.2009	125,4	112,7	169,3	132,9	02.10.2009	198,0	137,8	251,2	125,1
15.07.2009	46,7	43,1	48,6	52,5	05.10.2009	128,8	142,4	196,3	105,4
blank 37,3									
Zytokin: IL-2					Zytokin: IL-2				
blank 48,3					blank 48,3				
14.10.2009	6317,3	3211,5	4346,2	3192,3	19.10.2009	6317,3	4096,2	5721,2	4605,8
29.9.2009	4288,5	3346,2	5375,0	6932,7	02.10.2009	4278,8	5990,4	7240,4	6163,5
15.07.2009	5727,3	2919,2	4858,6	3333,3	05.10.2009	2884,6	3307,7	3894,2	6923,1
blank 36,1									
Zytokin: IFN γ					Zytokin: IFN γ				
blank 75,1					blank 75,1				
14.10.2009	2230,8	400,0	3984,6	701,5	19.10.2009	3615,4	1021,5	4953,8	904,6
29.9.2009	4384,6	584,6	4461,5	3338,5	02.10.2009	4784,6	1250,8	2923,1	3200,0
15.07.2009	842,5	66,8	1425,2	203,1	05.10.2009	4415,4	1309,2	3030,8	1923,1
blank 30,5									

Tab. zu 3.9: Originalmessdaten der Multiplex Zytokinmessungen. Aufistung nach Zytokinen, Zeit und Datum. Abkürzungen: Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/-CD28 (T+Beads) in argininhaltigem (+Arg) oder argininfreiem Medium (-Arg), Stimulation mit Superantigen SEB beladenen B-Zellen (T+B+SEB); T-Zellen mit unbeladenen B-Zellen (T+B) und T-Zellen alleine (T unstim.) als Kontrollen. Gezeigt werden die Originaldaten der Multiplex Zytokinmessung.

6 Literaturverzeichnis

Abe H, Obinata T, Minamide LS, Bamberg JR. 1996. *Xenopus laevis* actin-depolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development. *J Cell Biol* 132: 871-885.

Acuto O, Michel F. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3: 939-951.

Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y. 2000. The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30: 3422-3431.

Andrianantoandro E, Pollard TD. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell* 24: 13-23.

Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393: 805-809.

Aulak KS, Mishra R, Zhou L, Hyatt SL, de Jonge W, Lamers W, Snider M, Hatzoglou M. 1999. Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *J Biol Chem* 274: 30424-30432.

Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P. 2004. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem* 279: 5288-5297.

Bamburg JR. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 185-230.

Baniyash M. 2004. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 4: 675-687.

Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125: 1111-1124.

Billadeau DD, Burkhardt JK. 2006. Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic* 7: 1451-1460.

Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 7: 131-143.

Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3: 87-98.

Borst J, Coligan JE, Oettgen H, Pessano S, Malin R, Terhorst C. 1984. The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature* 312: 455-458.

Bronte V, Zanovello P. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5: 641-654.

Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. 2003a. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 24: 302-306.

Bronte V, et al. 2005. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med* 201: 1257-1268.

Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I. 2003b. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 170: 270-278.

Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. 2008. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 26: 233-259.

Cannon JL, Labno CM, Bosco G, Seth A, McGavin MH, Siminovitch KA, Rosen MK, Burkhardt JK. 2001. Wasp recruitment to the T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity* 15: 249-259.

Carlier MF. 1987. Measurement of Pi dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 1069-1075.

Carraway MS, Piantadosi CA, Jenkinson CP, Huang YC. 1998. Differential expression of arginase and iNOS in the lung in sepsis. *Exp Lung Res* 24: 253-268.

Chan AY, Bailly M, Zebda N, Segall JE, Condeelis JS. 2000. Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J Cell Biol* 148: 531-542.

- Condeelis J. 2001. How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol* 11: 288-293.
- Cooper JA. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105: 1473-1478.
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. 1995. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 667-673.
- Curiel TJ. 2007. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 117: 1167-1174.
- Davis SJ, van der Merwe PA. 1996. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today* 17: 177-187.
- Delon J, Germain RN. 2000. Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* 10: R923-933.
- DiNubile MJ, Cassimeris L, Joyce M, Zigmond SH. 1995. Actin filament barbed-end capping activity in neutrophil lysates: the role of capping protein-beta 2. *Mol Biol Cell* 6: 1659-1671.
- Du J, Frieden C. 1998. Kinetic studies on the effect of yeast cofilin on yeast actin polymerization. *Biochemistry* 37: 13276-13284.
- Eibert SM, Lee KH, Pipkorn R, Sester U, Wabnitz GH, Giese T, Meuer SC, Samstag Y. 2004. Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1957-1962.
- El-Gayar S, Thuring-Nahler H, Pfeilschifter J, Rollinghoff M, Bogdan C. 2003. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J Immunol* 171: 4561-4568.
- Finco TS, Kadlecsek T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A. 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9: 617-626.
- Fischer KD, Tedford K, Penninger JM. 1998a. Vav links antigen-receptor signaling to the actin cytoskeleton. *Semin Immunol* 10: 317-327.
- Fischer KD, et al. 1998b. Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* 8: 554-562.

Gallina G, et al. 2006. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 116: 2777-2790.

Germain RN. 2001. The T cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. *J Biol Chem* 276: 35223-35226.

Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. 2004. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 304: 743-746.

Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL, Wilson KT. 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13844-13849.

Gomez-Marquez J, Dosil M, Segade F, Bustelo XR, Pichel JG, Dominguez F, Freire M. 1989. Thymosin-beta 4 gene. Preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells, and lymphocytes. *J Immunol* 143: 2740-2744.

Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356: 607-609.

Hartwig JH, Chambers KA, Hopcia KL, Kwiatkowski DJ. 1989. Association of profilin with filament-free regions of human leukocyte and platelet membranes and reversible membrane binding during platelet activation. *J Cell Biol* 109: 1571-1579.

Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, Racke K. 1995. Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Lett* 359: 251-254.

Hinnebusch AG. 1994. The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. *Semin Cell Biol* 5: 417-426.

Hosseini BH, Louban I, Djandji D, Wabnitz GH, Deeg J, Bulbuc N, Samstag Y, Gunzer M, Spatz JP, Hammerling GJ. 2009. Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17852-17857.

Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P. 2005. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* 16: 649-664.

Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J. 2002. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 12: 79-84.

Iida K, Moriyama K, Matsumoto S, Kawasaki H, Nishida E, Yahara I. 1993. Isolation of a yeast essential gene, COF1, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-M(r) actin-binding and depolymerizing protein. *Gene* 124: 115-120.

K. Murphy PT, M. Walport. 2009. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Kane LP, Lin J, Weiss A. 2002. It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol* 23: 413-420.

Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, Christianson DW. 1996. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 383: 554-557.

Kenney D, Cairns L, Remold-O'Donnell E, Peterson J, Rosen FS, Parkman R. 1986. Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 68: 1329-1332.

Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK. 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 404: 151-158.

Klemke M, Wabnitz GH, Funke F, Funk B, Kirchgessner H, Samstag Y. 2008. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity* 29: 404-413.

Kropf P, et al. 2007. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol* 37: 935-945.

Kummerow C, Junker C, Kruse K, Rieger H, Quintana A, Hoth M. 2009. The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes. *Immunol Rev* 231: 132-147.

Kung JT, Brooks SB, Jakway JP, Leonard LL, Talmage DW. 1977. Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J Exp Med* 146: 665-672.

Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr., Ratan RR. 2003. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4843-4848.

Lee KH, Meuer SC, Samstag Y. 2000. Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur J Immunol* 30: 892-899.

Lewis CE, Pollard JW. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66: 605-612.

Liu Y, Van Ginderachter JA, Brys L, De Baetselier P, Raes G, Geldhof AB. 2003. Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells. *J Immunol* 170: 5064-5074.

Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. 2009. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *Br J Pharmacol* 158: 652-664.

McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* 138: 771-781.

Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, Fox D, Acuto O, Fitzgerald KA, Hodgdon JC, Protentis JP, Schlossman SF, Reinherz EL. 1984. An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36: 897-906.

Meurs H, McKay S, Maarsingh H, Hamer MA, Macic L, Molendijk N, Zaagsma J. 2002. Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol* 136: 391-398.

Mistry SK, Zheng M, Rouse BT, Morris SM, Jr. 2001. Induction of arginases I and II in cornea during herpes simplex virus infection. *Virus Res* 73: 177-182.

Modolell M, et al. 2009. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e480.

Moingeon P, Chang HC, Sayre PH, Clayton LK, Alcover A, Gardner P, Reinherz EL. 1989. The structural biology of CD2. *Immunol Rev* 111: 111-144.

Moon AL, Janmey PA, Louie KA, Drubin DG. 1993. Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J Cell Biol* 120: 421-435.

Moriyama K, Iida K, Yahara I. 1996. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1: 73-86.

Morris CR, Morris SM, Jr., Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, Machado L, Kuypers FA, Vichinsky EP. 2003. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med* 168: 63-69.

Mouneimne G, DesMarais V, Sidani M, Scemes E, Wang W, Song X, Eddy R, Condeelis J. 2006. Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. *Curr Biol* 16: 2193-2205.

Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7: 445-480.

Muller I, Hailu A, Choi BS, Abebe T, Fuentes JM, Munder M, Modolell M, Kropf P. 2008. Age-related alteration of arginase activity impacts on severity of leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e235.

Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6181-6186.

Munder M, et al. 2006. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 108: 1627-1634.

Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J. 2005. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105: 2549-2556.

Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22: 633-642.

Murphy K, Travers P, Walport M. 2009. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Oberlies J, Watzl C, Giese T, Luckner C, Kropf P, Muller I, Ho AD, Munder M. 2009. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J Immunol* 182: 5259-5267.

Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, Griffen MM, Maley ME, Rockich AK, Tsuei BJ, Boulanger BR, Kearney PA, Morris Jr SM, Jr. 2001. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann Surg* 233: 393-399.

Oh-hora M, Rao A. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20: 250-258.

Pantaloni D, Carlier MF. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75: 1007-1014.

Pollard TD, Cooper JA. 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 55: 987-1035.

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 545-576.

Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, Sharma A, Dhala R, Mills GB, Miller RG. 1996. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 156: 1788-1798.

Raines KW, Kang TJ, Hibbs S, Cao GL, Weaver J, Tsai P, Baillie L, Cross AS, Rosen GM. 2006. Importance of nitric oxide synthase in the control of infection by *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 74: 2268-2276.

Reth M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338: 383-384.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. 2004. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 84: 731-765.

Rivero-Lezcano OM, Marcilla A, Sameshima JH, Robbins KC. 1995. Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* 15: 5725-5731.

Rodriguez PC, Ochoa AC. 2008. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222: 180-191.

Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109: 1568-1573.

Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. 2002. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 277: 21123-21129.

Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC. 2005. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 202: 931-939.

Rodriguez PC, et al. 2004. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64: 5839-5849.

Rohatgi R, Ho HY, Kirschner MW. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* 150: 1299-1310.

Rohde J, Heitman J, Cardenas ME. 2001. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* 276: 9583-9586.

Rouzaut A, Subira ML, de Miguel C, Domingo-de-Miguel E, Gonzalez A, Santiago E, Lopez-Moratalla N. 1999. Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. *Biochim Biophys Acta* 1451: 319-333.

Samelson LE. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 20: 371-394.

Samstag Y, Nebl G. 2005. Ras initiates phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/PKB mediated signalling pathways in untransformed human peripheral blood T lymphocytes. *Adv Enzyme Regul* 45: 52-62.

Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH. 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* 73: 30-48.

Samstag Y, Dreizler EM, Ambach A, Sczakiel G, Meuer SC. 1996. Inhibition of constitutive serine phosphatase activity in T lymphoma cells results in phosphorylation of pp19/cofilin and induces apoptosis. *J Immunol* 156: 4167-4173.

Savignac M, Mellstrom B, Naranjo JR. 2007. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch* 454: 523-533.

Selvaraj P, Plunkett ML, Dustin M, Sanders ME, Shaw S, Springer TA. 1987. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 326: 400-403.

Serafini P, Borrello I, Bronte V. 2006a. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16: 53-65.

Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, Dolcetti L, Bronte V, Borrello I. 2006b. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 203: 2691-2702.

Shevchenko A, Loboda A, Ens W, Standing KG. 2000. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Anal Chem* 72: 2132-2141.

Sidani M, et al. 2007. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J Cell Biol* 179: 777-791.

Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. 2005. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* 174: 636-645.

Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27: 591-619.

Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14.

Valensin S, Paccani SR, Olivieri C, Mercati D, Pacini S, Patrussi L, Hirst T, Lupetti P, Baldari CT. 2002. F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts. *Eur J Immunol* 32: 435-446.

van Rheenen J, Condeelis J, Glogauer M. 2009. A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells. *J Cell Sci* 122: 305-311.

Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerkhove J, Ampe C. 2008. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* 87: 649-667.

Vartiainen MK, Mustonen T, Mattila PK, Ojala PJ, Thesleff I, Partanen J, Lappalainen P. 2002. The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol Biol Cell* 13: 183-194.

Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD. 2003. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19: 9-12.

Wabnitz GH, Nebl G, Klemke M, Schroder AJ, Samstag Y. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase functions as a Ras effector in the signaling cascade that regulates dephosphorylation of the actin-remodeling protein cofilin after costimulation of untransformed human T lymphocytes. *J Immunol* 176: 1668-1674.

Wang J, Xi L, Hunt JL, Gooding W, Whiteside TL, Chen Z, Godfrey TE, Ferris RL. 2004. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res* 64: 1861-1866.

Wang W, Mouneimne G, Sidani M, Wyckoff J, Chen X, Makris A, Goswami S, Bresnick AR, Condeelis JS. 2006. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol* 173: 395-404.

Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. 2005. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem* 280: 12683-12689.

Weiner CP, Knowles RG, Stegink LD, Dawson J, Moncada S. 1996. Myometrial arginase activity increases with advancing pregnancy in the guinea pig. *Am J Obstet Gynecol* 174: 779-782.

Weiss A, Littman DR. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76: 263-274.

Wingren AG, Parra E, Varga M, Kalland T, Sjogren HO, Hedlund G, Dohlsten M. 1995. T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit Rev Immunol* 15: 235-253.

Wittchen ES. 2009. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci* 14: 2522-2545.

Wu CW, Chi CW, Ho CK, Chien SL, Liu WY, P'Eng F K, Wang SR. 1994. Effect of arginase on splenic killer cell activity in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci* 39: 1107-1112.

Yamaguchi H, et al. 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* 168: 441-452.

Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K. 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393: 809-812.

Yonezawa N, Nishida E, Sakai H. 1985. pH control of actin polymerization by cofilin. *J Biol Chem* 260: 14410-14412.

Zabaleta J, McGee DJ, Zea AH, Hernandez CP, Rodriguez PC, Sierra RA, Correa P, Ochoa AC. 2004. *Helicobacter pylori* arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J Immunol* 173: 586-593.

Zea AH, Culotta KS, Ali J, Mason C, Park HJ, Zabaleta J, Garcia LF, Ochoa AC. 2006. Decreased expression of CD3zeta and nuclear transcription factor kappa B in patients with pulmonary tuberculosis: potential mechanisms and reversibility with treatment. *J Infect Dis* 194: 1385-1393.

Zea AH, et al. 2005. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 65: 3044-3048.

Zebda N, Bernard O, Bailly M, Welte S, Lawrence DS, Condeelis JS. 2000. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J Cell Biol* 151: 1119-1128.

Zimmermann N, Rothenberg ME. 2006. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur J Pharmacol* 533: 253-262.

Zimmermann N, et al. 2003. Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 111: 1863-1874.

7 Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
A	Ampere (Einheit der Stromstärke)
AARE	engl. Amino acid response element
Abb.	Abbildung
ADF	engl. actin depolymerising factor
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgemeinschaft
AK	Antikörper
Akt	Serin/Threonin Kinase (Proteinkinase B)
AP-1	engl. Activation protein-1
APS	Ammoniumsulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle(n)
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
Arg(-)Medium	argininfreies Zellkulturmedium
Arg(+)-Medium	argininhaltiges Zellkulturmedium
Arp2/3	engl. Actin related proteins
ASL	Argininosuccinat Lyase
ASS	Argininosuccinat Synthase
ATF	engl. Activating transcription factor
ATP	Adenosintrisphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
C°	Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Calcium
CAT	engl. Cationic amino acid transporter
CD	engl. Cluster of Differentiation (System zur Bezeichnung von Differenzierungsantigenen)

CD2	Adhäsion und aktivierender Rezeptor auf T- und NK-Zellen; Ligand: CD58
CD80	Ligand für CD28 und CTLA-4 (B7.1)
CD86	Ligand für CD28 und CTLA-4 (B7.2)
Cdc-42	engl. Cell division cycle 42
cdk	engl. cyclin-dependent kinase
CFSE	Carboxy-Fluoreszein-Succinimidyl-Ester
CHOP	engl. C/EBP-homologe proteine
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	engl. counts per minute (radioaktive Ereignisse pro Minute)
cSMAC	engl. central supramolecular activation cluster
CTLA-4	engl. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DAG	Diacylglycerin
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiotreitol
DZ	dendritische Zelle(n)
EC	Effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2- α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
ELISA	engl. enzyme linked immuno sorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	engl. extracellular-regulated kinase
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FACScan	engl. Fluorescence Activated Cell Scanner
F-Aktin	filamentöses Aktin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (Fluoreszenz-Farbstoff)
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht, Messparameter des FACScan R)

Fyn	Proteintyrosinkinase
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
Gr-1	engl. granulocyte-differentiation antigen 1
Grb2	engl. growth factor receptor bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray (Strahlenintensität)
h	hora (Stunde)
H ₂ O	Wasser (Millipore)
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	engl. horseradish peroxidase
ICAM	engl. Intracellular adhesion molecule
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxydsynthase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IS	Immunologische Synapse
ITAM	engl. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kDa	kilo Dalton (Einheit des Molekulargewichtes)
konz.	konzentriert
L	Liter
LAT	engl. Linker for aktivation of T cells
Lck	engl. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	engl. Lymphocyte function-associated antigen
LIMK	engl. LIM motif containing protein kinase
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli (x 10 ³)
M	mol/l (Einheit der Konzentration)
MAPK	engl. Mitogen activated protein kinase
min	Minute(n)

mol	molar (Einheit der Stoffmenge)
MEK	MAPK-Kinase
MHC	engl. Major histocompatibility complex
μ	mikro ($\times 10^6$)
min	Minute(n)
mRNA	engl. Messenger RNA
MSC	engl. Myeloid suppressor cell
mTOR	engl. Mammalian target of rapamycin
MW	arithmetischer Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
Nck	engl. Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
NFAT	engl. Nuclear factor of activated t-cells
NF-κB	engl. Nuclear factor κ-B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
nor-NOHA	Nφ-Hydroxy-nor-L-Arginin
Nr.	Nummer
OAT	Ornithin-Amino-Transferase
ODC	Ornithin-Decarboxylase
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeiten zweier Datengruppen
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	engl. programmed death 1
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenz-Farbstoff)
PenStrep	Penicillin/ Streptomycin
PerCp	Phycoerythrin (Fluoreszenz-Farbstoff)
PFA	Paraformaldehyd
pGCN2	an Threonin 898 phosphorylierte GCN2-Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
PMN	engl. polymorphonuclear neutrophils (humane Granulozyten)
pSMAC	engl. peripheral supramolecular activation cluster
Rac	kleines GTP-Bindeproteine
Raji	Burkitt Lymphom B-Zellen (Raji)
Ras	kleines G-Protein mit GTPase-Aktivität
Rho	GTPase
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDF-1 α	engl. Stromal cell-derived factor 1 α
SDS	engl. Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B
siRNA	small interfering RNA
SLP-76	engl. SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
SSC	engl. Side Scatter (Seitwärtsstreulicht, Messparameter des FACS)
SSH	Slingshotphosphatase
T, t	engl. time
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TESK	engl. testicular protein kinase (testikuläre Proteinkinase)
TGF- β	engl. transforming growth factor β
TNF	Tumornekrosfaktor

T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
tRNA	engl. transporter RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
U	engl. Unit (Einheit)
u. a.	unter anderem
unstim.	unstimuliert
v. a.	vor allem
Vav	Guanosinnukleotid-Austauschfaktor
VCAM	engl. vascular cell adhesion molecule
vgl.	vergleiche
Wasp	engl. Wiskott-Aldrich syndrome proteine
ZAP-70	engl. z-associated protein of 70 kDa
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Markus Munder für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung während der Erstellung meiner Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Meuer möchte ich mich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Immunologie durchführen und die vorhandenen Geräte verwenden zu dürfen, bedanken.

Für die sehr gute Einarbeitung und stete Hilfsbereitschaft während der Anfertigung meiner Doktorarbeit möchte ich mich herzlichst bei Frau Claudia Luckner-Minden bedanken.

Für die Bereitschaft als Erstgutachter meiner Dissertation und Prüfer für meine Disputation zu fungieren, möchte ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Philipp Beckhove bedanken.

Bei Herrn Prof. Carsten Watzl möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitschaft als einer meiner Prüfer zu fungieren bedanken.

Für die stets nette Kooperation und Hilfsbereitschaft möchte ich mich herzlichst bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Yvonne Samstag am Institut für Immunologie des Universitätsklinikum Heidelberg bedanken, besonders bei Herrn Dr. Guido Wabnitz, Frau Dipl.-Biologin Beate Jahraus und Herrn Henning Kirschgessner.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Thomas Franz, Herrn Stefan Leicht und Sabrina Rüggeberger der Core Facility am Embl in Heidelberg für die nette Kooperation und die Massenspektrometrischen Analysen meiner 2D-Gele.

Bei Frau Michelle Bhairo, Frau Johanna Ried und Frau Katharina Kapp möchte ich mich herzlich für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderer als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren versichere ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Rheinstetten, 11.05.2010