

**Masern Virus Interferenz mit T-Zell-Aktivierung:
Einfluß auf Zytoskelettdynamik, Mobilität und
Interaktion mit Dendritischen Zellen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Nora Müller
aus Altenburg

Würzburg 2006

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 7 |
| 1.1. Das Masernvirus | 7 |
| 1.1.1. Allgemeines | 7 |
| 1.1.2. Klinik | 7 |
| 1.1.3. Pathogenese | 8 |
| 1.1.4. Taxonomie | 9 |
| 1.1.5. Virusstruktur | 10 |
| 1.1.6. Rezeptoren für Masernvirus | 11 |
| 1.2. Die Masernvirus-induzierte Immunsuppression | 14 |
| 1.3. Bedeutung von molekulare Motoren in der Dynamik von T-Zell-Aktivierung | 17 |
| 1.3.1. T-Zell-Aktivierung | 17 |
| 1.3.2. F-Aktin: der Hauptbestandteil des zellulären Zytoskeletts | 19 |
| 1.3.3. Die immunologische Synapse | 20 |
| 1.3.4. Membran-Zytoskelett-Interaktionen | 22 |
| 1.3.5. T-Zell-Migration | 25 |
| 2. Fragestellung | 28 |
| 3. Material | 29 |
| 3.1. Geräte | 29 |
| 3.2. Verbrauchsmaterial | 29 |
| 3.3. Zelllinien | 30 |
| 3.4. Primäre humane Zellen | 30 |
| 3.5. Virusstämme | 30 |
| 3.6. Medien und Lösungen | 31 |
| 3.7. Western Blot | 33 |
| 3.8. Bestimmung der Proteinkonzentration | 35 |
| 3.9. Immunfluoreszenzfärbungen | 35 |
| 3.10. Antikörper | 36 |
| 3.11. Beschichtung von Objektträgern und Platten | 38 |
| 3.12. «kits» | 38 |
| 3.13. Fusionsinhibitor (FIP) | 38 |
| 3.14. Verschiedenes | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Methoden | 40 |
| 4.1. Zellbiologische Methoden | 40 |
| 4.1.1. Kultur von Vero-Zellen | 40 |
| 4.1.2. Kultur von BJAB-Zellen | 40 |
| 4.1.3. Kultur von B95a-Zellen | 40 |
| 4.1.4. Kultur von U251-Zellen | 40 |
| 4.1.5. Reinigung von primären humanen Lymphozyten mittels Leukapherese | 41 |
| 4.1.6. Kultur primärer humaner T-Zellen | 43 |
| 4.2. Virologische Methoden | 44 |
| 4.2.1. Zucht des MV Vakzinestammes ED | 44 |
| 4.2.2. Zucht des MV Wildtypstammes WTF | 45 |
| 4.2.3. Reinigung von MV WTF durch Ultrazentrifugation | 45 |
| 4.2.4. Bestimmung des Virustiters TCID ₅₀ | 47 |
| 4.3. Experimentelle Methoden | 48 |
| 4.3.1. Western Blot | 48 |
| 4.3.2. Virusbindung an T-Zellen | 50 |
| 4.3.3. CD3/CD28 Costimulation Virus-behandelter T-Zellen | 51 |
| 4.3.4. Analyse von phosphorylierten Proteinen | 51 |
| 4.3.5. <i>Pull down</i> Assay zur Bestimmung der Aktivität von Rho GTPasen | 52 |
| 4.3.6. Immunfluoreszenzfärbung | 54 |
| 4.3.7. T-Zell-Polarisierung | 54 |
| 4.3.8. T-Zell-Adhärenzassay | 55 |
| 4.3.9. Generierung von dendritischen Zellen (MoDC) aus primären Monozyten – Analyse der DC/T-Zell-Konjugatbildung | 56 |
| 4.3.10. Transfektion von primären T-Zellen | 57 |
| 4.3.11. <i>Live cell imaging</i> | 57 |
| 4.3.12. Konfokale Mikroskopie | 58 |
| 4.3.13. Rasterelektronenmikroskopie | 58 |
| 5. Ergebnisse | 59 |
| 5.1. T-Zell-Stimulation durch CD3/CD28 Ligation | 59 |
| 5.2. WTF-Bindung an T-Zellen verhindert Transport von Vav an die Plasmamembran | 63 |
| 5.3. Aktivierungscluster und Lokalisation der GTPasen Cdc42 und Rac1 ist in CD3/CD28 stimulierten T-Zellen nach WTF-Bindung verändert | 64 |
| 5.4. MV-Bindung an T-Zellen interferiert mit CD3/CD28 stimulierter Aktivierung von F-Aktin und Membranexpansion | 70 |
| 5.5. WTF beeinflusst T-Zell-Polarisierung und Adhärenz auf Fibronectin | 72 |
| 5.6. Effekt MV-infizierter Zellen auf die Morphologie und Geschwindigkeit von T-Zellen (<i>live cell imaging</i>) | 76 |
| 5.7. WTF reduziert drastisch die Ausbildung Mikrovilli-ähnlicher Strukturen | 78 |
| 5.7.1. WTF beeinflusst die Phosphorylierung von Membranlinkerproteinen | 79 |
| 5.7.2. WTF-Bindung an T-Zellen reduziert drastisch die Formation Mikrovilli-ähnlicher Strukturen | 80 |

| | |
|---|------------|
| 5.7.3. Rasterelektronenmikroskopische Analyse WTF-behandelter T-Zellen | 82 |
| 5.8. WTF-Bindung an T-Zellen führt zur Aktivierung von F-Aktin in nicht-stimulierten Zellen | 84 |
| 5.9. WTF-Bindung induziert die Aktivierung von Cofilin | 85 |
| 5.10. WTF stört die Ausbildung einer reifen immunologischen Synapse | 87 |
| 5.11. Analyse der DC/T-Zell-Konjugatbildung WTF-infizierter MoDCs | 94 |
| | |
| 6. Diskussion | 97 |
| | |
| 7. Zusammenfassung | 108 |
| | |
| 7.1. Summary | 109 |
| | |
| 8. Abkürzungsverzeichnis | 110 |
| | |
| 9. Literatur | 115 |
| | |
| 10. Veröffentlichungen | 129 |
| | |
| 11. Danksagung | 131 |
| | |
| 12. Lebenslauf | 132 |

1. Einleitung

1.1. Das Masernvirus

1.1.1. Allgemeines

Die akuten Masern sind eine weltweit verbreitete schwere Infektionskrankheit. Die erste Beschreibung der Masernerkrankung ist etwa 1000 Jahre alt (1). 1906 beschrieb Pirquet die immunsuppressive Wirkung des Masernvirus (MV). Er stellte fest, dass im Verlauf einer Erkrankung eine vorher positive Tuberkulinreaktion negativ wird. Das Masernvirus ist damit das erste Virus, für das eine immunsuppressive Wirkung beschrieben wurde. 1911 wurde der Masernerreger auf Affen übertragen und 1954 erstmals aus Zellkulturen isoliert. Die durch das Masernvirus ausgelösten akuten Masern sind in den Entwicklungsländern, vor allem in Afrika, eine gefährliche Erkrankung bei Kindern in den ersten Lebensjahren. Hier gehören sie zu den zehn häufigsten Infektionskrankheiten und der Anteil tödlicher Verläufe ist besonders hoch (2). Trotz Vorhandensein einer Lebendvakzine erkranken jährlich mehr als 30 Millionen Menschen an Masern, wobei über eine halbe Million der Fälle tödlich endet (3). Der größte Teil der Mortalität ist auf die durch Masernvirus induzierte ausgeprägte Immunsuppression zurückzuführen, die virale, bakterielle und parasitäre Sekundärinfektionen begünstigt. In Deutschland treten noch ca. 1.200 MV-Infektionen pro Jahr auf (2, 4). Etwa eine in 10.000–20.000 Masernvirusinfektionen verläuft in Deutschland tödlich (2).

1.1.2. Klinik

Die Masern sind eine schwere, hochfieberhafte Erkrankung. Nach einer Inkubationszeit von neun bis zwölf Tagen treten Fieber, Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit und ausgeprägte katarrhalische Symptome wie trockener Husten, Schnupfen, Konjunktivitis sowie Photophobie und Tränenfluß auf. Etwa drei Tage später kommt es zu Auftreten pathognomischer Veränderung der Mundschleimhaut, welche als sogenannte *Kopliksche Flecken* bezeichnet werden (5). Es handelt sich dabei um kleine, kalkspritzerähnliche, fest anhaftende

Stippchen, die von geröteten Hof umgeben sind. Einen Tag später verstärken sich die allgemeinen und die katarrhalischen Erscheinungen und es kommt zum Auftreten eines makulopapulösen Exanthems, verursacht durch die Zerstörung MV-infizierter Epithelzellen durch T-Zellen. Das Exanthem tritt zuerst im Gesicht und hinter den Ohren auf. Innerhalb der nächsten drei Tage breitet es sich langsam über den ganzen Körper aus. Die symptomatische Phase der Masernerkrankungen dauert etwa 10 Tage. Ein Erkrankungsverlauf ohne dieses Exanthem wird als „atypische“ Masern oder „weiße“ Masern bezeichnet. Als Komplikationen treten Otitis media, Pneumonie, Diarrhoe und Enzephalitis auf (5). Des Weiteren kann die MV-Infektion auch schwere neurologische Komplikationen verursachen. Dazu gehört die *akute postinfektiöse Enzephalitis*, welche sich 2-4 Wochen nach Auftreten des Ausschlages entwickelt, oder späte und letal verlaufende Komplikationen, wie die nur bei immunsupprimierten Patienten auftretende *Einschlußkörperchen-Enzephalitis* (MIBE: *measles inclusion body encephalitis*), die sich einige Monate nach der akuten Phase anschließt und die *Subakute Sklerosierende Panencephalitis* (SSPE), welche einige Jahre nach der Masernerkrankung auftritt und durch eine persistierende MV-Infektion hervorgerufen wird (7, 8).

1.1.3. Pathogenese

Die Übertragung des Masernvirus erfolgt durch Tröpfcheninfektion von Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut sowie der Augenbindehaut oder durch direkten Kontakt (9). Die Erkrankung erfolgt meist im Kindes- und frühen Jugendalter. Das Virus infiziert vermutlich zuerst die Epithelzellen des Respirationstraktes und des Oropharynx. Die initiale MV-Infektion beginnt im respiratorischen Trakt, das Virus repliziert in trachealen und bronchialen Epithelzellen und breitet sich zu den drainierenden Lymphknoten aus (7). Die Schädigung des bronchialen Flimmerepithels fördert die Superinfektion mit bakteriellen Erregern, so dass eine Lungenentzündung entstehen kann. Das Virus repliziert für 2-4 Tage lokal in der Mukosa und den drainierenden Lymphknoten und breitet sich dann, an Lymphozyten gebunden, über den Blutstrom aus. Von den lokalen Lymphknoten geht die erste Virämie aus. Infolge der MV-Infektion bilden sich charakteristische retikuloendotheliale Riesenzellen (*Warthin-Finkeldy-Zellen*) (10), von denen sich vermutlich die Virusinfektion hauptsächlich in andere Gewebe ausbreitet. Die zunehmende Anzahl von

Riesenzellen in lymphatischen Gewebe zeigen, dass lymphoide Organe und Gewebe (z.B. Thymus, Milz, Lymphknoten, Appendix, Tonsillen) wichtige Orte der Virusreplikation sind (7,10). In der Milz sind Makrophagen-reiche Regionen die Hauptorte der Virusreplikation (7,11). Im Thymus sind epitheliale Zellen infiziert, welche zur Apoptose der Thymozyten führt (7). Das Virus verbreitet sich in einer zweiten Virämie von den primären Infektionsorten zu vielen weiteren Organen (z.B. Haut, Niere, Lunge Gastrointestinaltrakt, Leber u.a., 7) aus. In diesen verschiedenen Geweben repliziert das Virus primär in Endothelzellen, epithelialen Zellen und/oder Makrophagen und Monozyten (7,12-14).

1.1.4. Taxonomie

Die Familie der Paramyxoviren wird in zwei Unterfamilien eingeteilt, die *Paramyxovirinae* und die *Pneumovirinea* (7) und beinhalten einige der wichtigsten Krankheitserreger bei Mensch und Tier (**Tab. 1.1.**). Paramyxoviren und Rubulaviren besitzen ein Hämagglutinin und eine Neuramidase. Rubulaviren codieren außerdem für ein kleines hydrophobes Protein (SH), das mit der Hüllmembran verbunden ist. Morbilliviren, zu denen das Masernvirus gehört, besitzen ein Hämagglutinin ohne Neuramidaseaktivität. Die Vertreter der zweiten Familie, die Pneumoviren, besitzen keine Neuramidase und verfügen anstelle des Hämagglutinin über ein G-Protein, das allerdings keine hämagglutinierende Aktivität zeigt.

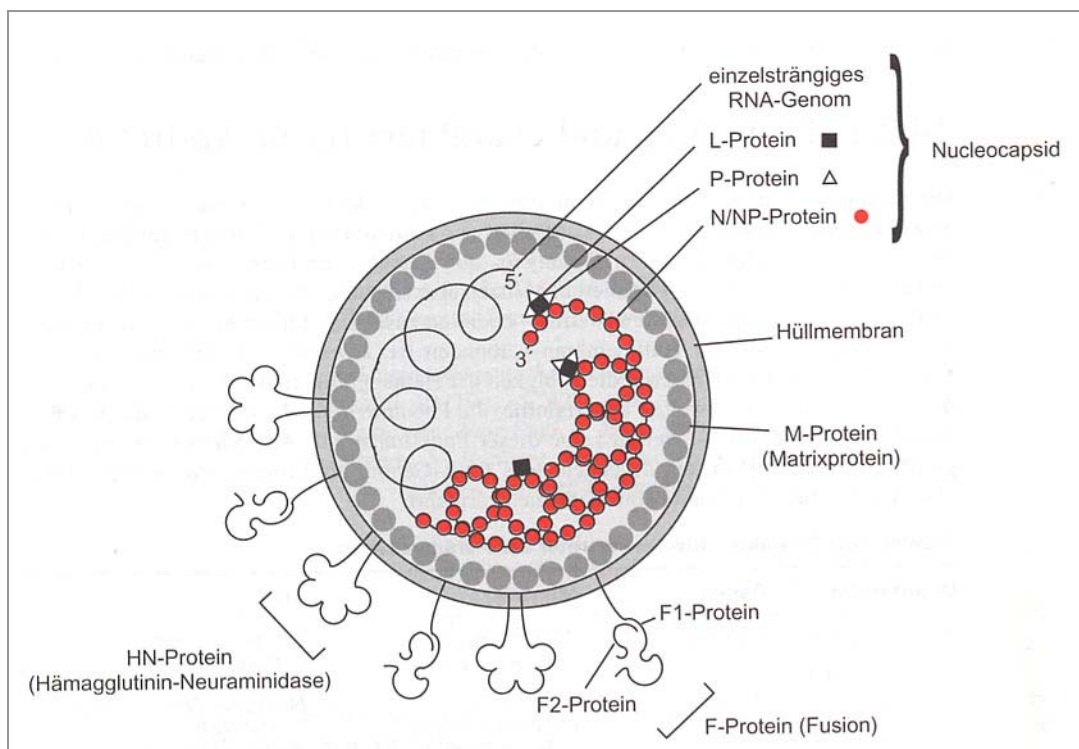
Tab. 1.1.: Charakteristische Vertreter der Paramyxoviren

| Unterfamilie | Genus | Mensch | Tier |
|------------------------|---------------|---|--|
| <i>Paramyxovirinae</i> | Paramyxovirus | Parainfluenzavirus Typ1+3 | Sendai Virus |
| | Rubulavirus | Mumpsvirus Parainfluenza Typ 2+4 | Newcastle-Disease-Virus (Geflügel) Vogelparamyxoviren Typen 2-9 |
| | Morbillivirus | Masernvirus | Hundestaupevirus Rinderpestvirus |
| <i>Pneumovirinae</i> | Pneumovirus | Respiratorisches Syncyticalvirus (RSV) | Respiratorisches Syncyticalvirus des Rindes |

Verändert nach: Modrow & Falke, Molekulare Virologie, 1998 (1)

1.1.5. Virusstruktur

Das infektiöse MV Partikel hat einen Durchmesser von ca. 150 – 200 nm. Das virale Genom besteht aus einsträngiger, unsegmentierter RNA von negativer Polarität. Der Ribonucleoproteinkomplex wird aus dem viralem Genom, dem Nucleocapsid-Protein (N), dem Phospho-Protein (P) und dem Large-Protein (L) gebildet. Das hochbasische C-Protein und das V-Protein, welches innerhalb des P-Gen kodiert werden, sind für die virale Replikation *in vitro* nicht erforderlich (15). Wahrscheinlich sind sie *in vivo* von pathogenetischer Bedeutung (15-18). Das N-Protein, die Hauptproteinkomponente des Nucleocapsids, dient zur Verpackung der viralen RNA und schützt diese vor dem Angriff zellulärer Ribonukleasen und bildet zusammen mit P und L den Replikationskomplex (**Schema 1.1.**).



Schema 1.1.: Schematischer Aufbau eines Maserviruspartikels. Verändert nach: Modrow & Falke, Molekulare Virologie, 1998 (1)

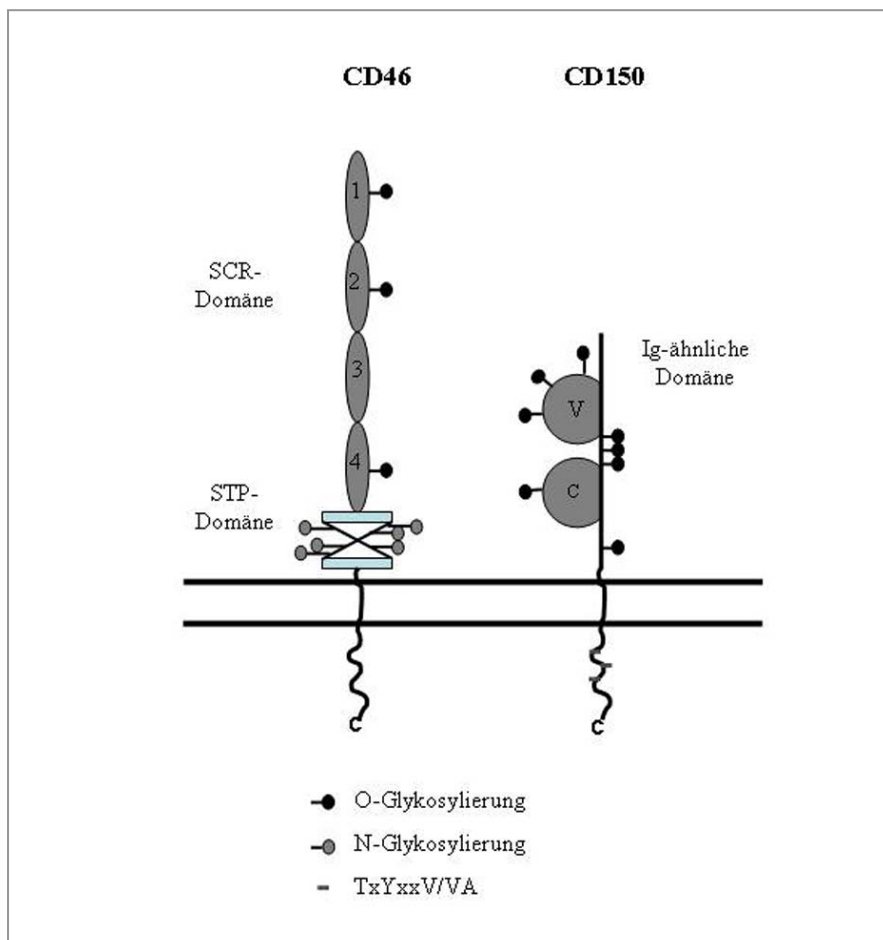
Das L-Protein (~200 kDa) ist mit dem P-Protein assoziiert und besitzt die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Der Ribonucleoproteinkomplex ist von einer Hüllmembran umgeben, welche der Wirtszellmembran entstammt. Das Matrixprotein

(M) verbindet das Nucleocapsid mit der Hüllmembran. In die Membran sind zwei Oberflächenproteine integriert: das Fusionsprotein (F) und das Hämagglutinin (H). Diese Proteine liegen als H-Tetramere und F-Trimere auf der Oberfläche infizierter Zellen und Viruspartikel vor. Das M-Protein interagiert mit den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine und kann die Fusionsaktivität regulieren (19). Das H-Protein ist ein Typ II-Transmembranprotein, welches die Bindung des Virus an den Rezeptor vermittelt und die Membranfusion unterstützt (20). Das F-Protein vermittelt die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran. Es ist ein Typ I-Glykoprotein und wird als Vorläuferprotein (Fo) synthetisiert und im TransGolgi-Apparat proteolytisch in die F1- und F2-Untereinheiten gespalten (21). Die beiden Untereinheiten sind über eine Disulfidbrücke verbunden. Die proteolytische Spaltung induziert eine Konformationsänderung, wodurch die stark hydrophobe Fusionsdomäne am N-Terminus des F1-Proteins freigesetzt wird, welche im Verlauf von Infektions- und Absorptionsprozessen die Fusion der viralen mit der zellulären Membran vermittelt (22-24). Eine zweite konformationelle Änderung wird durch Rezeptorerkennung und Interaktion mit dem H-Protein induziert (20). Die Bedeutung der Fusionsdomäne wird dadurch unterstützt, dass Peptide, die mit der Insertion der Domäne interferieren, die virale Membranfusion verhindern (25).

1.1.6. Rezeptoren für Masernvirus

Der erste identifizierte MV Rezeptor war das membranständige Cofaktorprotein CD46 (MCP), welches ubiquitär auf allen menschlichen kernhaltigen Zellen exprimiert wird (26-28). CD46 gehört zur Familie von Komplementregulatoren und ist ein Typ I Transmembranglykoprotein. Das Protein besteht aus vier extrazellulären Consensus-Domänen (SCR), einer stark glykosylierten Serin-Threonin-Prolin reichen Domäne (STP), einer Transmembrandomäne und einer von zwei durch alternatives *Splicing* generierten zytoplasmatischen Domäne Cyt1 (16 Aminosäuren) und Cyt2 (23 Aminosäuren) (**Schema 1.2.**). Obwohl in Geweben beide Splicevarianten exprimiert werden, wird z.B. im Hirn und Niere Cyt2 gewebespezifisch exprimiert (29-32). Auch humane Zelllinien (z.B. die Jurkat-T-Zelllinie) können entweder die eine oder andere zytoplasmatische Domäne exprimieren (33). Die biologische Rolle der unterschiedlich exprimierten *Splice*-Varianten der zytoplasmatischen Domänen von CD46 ist noch unklar. CD46 schützt alle kernhaltigen Zellen vor Komplement-

lyse, indem es als Cofaktor für den Komplementfaktor I wirkt, welcher C3b und C4b in die inaktive Form spaltet (34). Vor wenigen Jahren wurde CD46 auch als ein costimulatorisches Molekül in humanen T-Zellen identifiziert (35). CD46 kann intrazelluläre Signale transduzieren, die zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium und zur Tyrosin-Phosphorylierung zweier, in die T-Zell-Aktivierung involvierter Adapterproteine (CBL und LAT) führt (35-38). Die Bindung von MV H-Protein an die zwei distalen extrazellulären SCR-Domänen 1 und 2 wird von wenigen Aminosäuren im H-Protein determiniert (39,40). Dagegen bindet der Ligand des CD46 (C3b/C4b Komplementkomponente) an die beiden membranproximalen Domänen SCR 3 und 4 (29,41). Nach dem Kontakt mit dem H-Protein wird das CD46 Molekül von der Oberfläche infizierter Zellen herunterreguliert (42,43), was zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber Komplement-vermittelter Zellyse führt (44).



Schema 1.2.: Schematische Struktur der MV Rezeptoren CD46 und CD150.

Später wurde das humane costimulatorische Protein CD150 (SLAM: *signalling lymphocyte activation molecule*) als Rezeptor identifiziert (45,46). Auch dieses Molekül wird infolge des MV-Kontaktes herunterreguliert (47,48). CD150 ist ein Transmembranglykoprotein Typ I, welches auf aktivierten T- und B-Zellen, Gedächtniszellen, aktivierten Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird (10,28,49-52). Der Rezeptor besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen (**Schema 1.2.**), einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Region mit Tyrosin-Motiven. Studien haben gezeigt, das SLAM-Rezeptoren intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphorylierung über die Adaptorproteine SAP und/oder EAT-2 vermittelt und die Produktion des IFN γ von aktivierten T-Zellen modulieren kann (53,54). In der zytoplasmatischen Region des SLAM Rezeptors (**Schema 1.2.**) ist mit dem TIYxxV/I-Motif eine typische SAP-bindende Sequenz lokalisiert. Das SH2-Domäne-enthaltende Protein SAP ist essentiell für die Vermittlung von Protein-Tyrosin-Phosphorylierungssignalen (55-57) und, wie Studien vermuten lassen, rekrutiert und aktiviert SAP die Protein-Tyrosin-Kinase FynT (53,56). Aufgrund der Eigenschaft des SLAM Moleküls intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen zu vermitteln, könnte die durch Virusbindung induzierte Aktivierung und nachfolgende Herunterregulation des Rezeptors die Immunantwort *in vivo* beeinflussen (58,59). Sowohl Wildtypstämme als auch Vakzinestämme benutzen CD150 als Eintrittsrezeptor. CD46 wird vorwiegend von MV Vakzinestämmen genutzt, was vermutlich auf die langen Zellkulturpassagen dieser Viren in Vero-Zellen zurückzuführen ist (40,60). MV Wildtypstämme interagieren nicht oder wenig effizient mit CD46 (61). Des weiteren deutet der Tropismus von Wildtyp MV für Zellen, die kein SLAM exprimieren, wie epitheliale, endotheliale und neuronale Zelle (Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten), auf einen zusätzlichen Rezeptor hin (28, 62-65). Es wurde gezeigt, dass humane endotheliale CD46 positive Zelllinien, die kein SLAM exprimieren mit MV Wildtypstämmen, die keine Affinität zu CD46 besitzen (WTFb, Wü4797, Wü5679) infiziert werden können, und die Virusaufnahme nicht durch Blockade des CD46 Moleküls mit Antikörpern inhibiert werden konnte (47,66). Die These wird weiterhin durch Experimente unterstützt, die zeigten, dass ein rekombinantes eGFP-exprimierender MV Wildtypstamm unabhängig von der CD46 Expression SLAM negative Endothelzellen infizieren kann (67).

1.2. Masernvirus-induzierte Immunsuppression

Die ausgeprägte Immunsuppression während der MV-Infektion erhöht die Empfänglichkeit von Kindern für opportunistische Infektionen. Die Erkrankung ist verbunden mit einer transienten Lymphopenie und in einer Reduktion in der Anzahl von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten (7,14,68,69). Es sind verschiedene Abnormalitäten des Immunsystems beschrieben worden: Änderung in der Lymphozytenanzahl und -funktion, Verschiebung der Zytokinsekretion (IL-4, IL-10 und IL-12), immunmodulatorische Effekte von IL-10, unzureichende Antigenpräsentation und veränderte Signalwege von Interferon α/β (70,71).

In vitro Untersuchungen zeigen, dass die MV Infektion die Lebensfähigkeit, Reifung und Funktion professioneller Antigen-präsentierender Zellen verändert, was vermuten läßt, dass die Interferenz von MV mit DCs einen wichtigen Mechanismus der Immunsuppression darstellt. Humane DC (periphere DC aus dem Blut und generiert aus CD34+-Vorläuferzellen oder aus Monozyten) und Langerhans-Zellen der Haut sind in Zellkultur permissiv für MV (10,72-77). MV verändert *in vitro* die Antigenpräsentation, indem infizierte DCs die Fähigkeit naive CD4+ T-Zellen zu stimulieren verlieren und während der Cokultivierung mit T-Zellen apoptotisch werden (78). Desweiteren zeigen MV-infizierte Monozyten und DC eine verminderte IL-12 Produktion, einem Zytokin, das für die Induktion von T-Helferzellen Typ 1 (Th1) notwendig ist (79). Die Infektion von unreifen dendritischen Zellen mit MV verursacht, eine phänotypische Reifung der Zellen, die durch die Expression von MHCI und -II-Molekülen, CD40, CD80, CD86 und CD83 angezeigt wird (72,75,80).

Ein weiterer Mechanismus der MV-induzierte Immunsuppression könnte aus der Verschiebung der Zytokinantworten von einer Th1 Immunantwort in der akuten Phase der Erkrankung hin zu einer Th2 Antwort während der Rekonvaleszenz sein (69,81). MV-infizierte Patienten zeigen einen erhöhten IL-4 Spiegel was auf eine Th2 Antwort hindeutet. Außerdem wurde IL-10, ein Zytokin, das die Zytokinsynthese erniedrigt, die Aktivierung von Makrophagen und die T-Zell-Proliferation supprimiert, in *ex vivo* restimulierten Zellen von MV-infizierten Patienten nachgewiesen werden (81). Der suppressive Effekt von IL-4 und IL-10 auf Th1-Zellen und Makrophagen könnte zur MV-induzierten Immunsuppression beitragen und dadurch eine erhöhte Empfänglichkeit der Patienten für Sekundärinfektionen begünstigen (68). Es wurde gezeigt, das die Expression des MV Rezeptor CD150 in Th1-Zellen hoch, aber sehr niedrig in Th2-Zellen ist (82). Studien mit transgenen CD150 *knock-out* Mäusen zeigten, das CD150 die Funktion von T-Zellen und Makrophagen kontrolliert

(83). Die Herunterregulation des CD150 Moleküls während der MV Infektion könnte die Immunantwort von einer Th1-Antwort hin zu einer Th2-Antwort verschieben (84).

Infektion mit Wildtyp MV resultiert *in vitro* in einer signifikant verminderten Produktion von Interferon α und β (85). Neuere Studien lassen vermuten, dass die MV Nicht-Strukturproteine V und C mit dem Interferon α/β Signalwegen interferieren. Das MV V-Protein inhibiert die STAT1 und STAT2 Phosphorylierung und verhindert die INF-induzierte STAT-Translokation in den Zellkern (86). Da IFN α/β zusätzlich zur anti-viralen Zellantwort auch immunmodulatorische Funktion ausübt (Modulation der Reifung von DCs, Aktivierung von Makrophagen, Ausdehnung der Lebenspanne von T-Zellen) kann eine MV-induzierte Inhibition von IFN α/β oder IFN-Signalwegen auch einen Einfluß auf die Immunantwort *in vivo* haben (87,88).

Es ist das Kennzeichen der MV-induzierten Immunsuppression, dass aus Patientenblut isolierte Lymphozyten, auf mitogene oder TCR-induzierte Stimulation *ex vivo* nicht mehr proliferieren (70,71). Diese Proliferationshemmung ist nicht nur auf den zytopathischen Effekt der MV-Infektion in Zellkultur zurückzuführen, da der Kontakt von infizierten Zellen, die nach UV-Bestrahlung kein Virus mehr freisetzen, die Proliferation peripherer Blutlymphozyten nach Mitogenzugabe hemmen kann (89,90). Dabei ist der Kontakt nicht-infizierter Zellen mit dem MV Glykoproteinkomplex, bestehend aus dem F- und H-Protein, auf der Oberfläche infizierten Zellen bzw. auf viralen Partikeln ausreichend, um eine Proliferationsinhibition der T-Zellen zu induzieren (91). Es wurde gezeigt, dass die Proliferationshemmung auf den Kontakt mit dem MV Glykoproteinkomplex zurückzuführen ist, denn transfizierte Zellen, die MV F und H auf der Oberfläche exprimieren, induzieren eine Inhibition. Dabei ist die proteolytische Prozessierung des F0-Proteins in das F1/2 Heterodimer durch eine intrazelluläre Protease, z.B. Furin, für die Induktion der Immunsuppression *in vitro* absolut erforderlich (24,92). Rekombinante Masernviren, bei denen die MV-spezifischen Glykoproteine durch das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) ausgetauscht wurden, erzeugten keine Inhibition (90). Das zeigt, dass Proliferationsinhibition spezifisch durch die beiden MV Glykoproteine induziert wird. Charakteristisch für die Immunsuppression ist, dass primäre T-Zellen nach Kontakt mit MV weder auf mitogene, allogene oder CD3/CD28 induzierte Stimulation proliferieren (90). Diese T-Zellen sind nicht apoptotisch. Des weiteren ist die Hochregulation von T-Zell-spezifischen Aktivierungsmarkern und die Sekretion von Zytokinen nicht beeinflusst. Allerdings bewirkt der Kontakt

mit MV Glykoproteinen ein Arretieren der T-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (93,94). Obwohl die Expression des IL-2 Rezeptors nicht verändert ist, kann die Proliferationshemmung durch exogene Zugabe von IL-2 nicht aufgehoben werden (95). Infolge des MV-Kontaktes mit T-Zellen wird der Membrantransport und die Aktivierung von Proteinen, die für die vermittelten Signalen von IL-2 Rezeptor und TCR essentiell sind, verändert. Die MV-Bindung führt innerhalb weniger Stunden nach dem Kontakt zur Hemmung der IL-2 und CD3/CD28 stimulierten Akt-Kinase Aktivierung, aber inhibiert nicht die Aktivierung des Jak/STAT Signalweges (95). Akt-Kinase phosphoryliert oder komplexiert mit Proteinen, die Zellwachstum, Überleben, Differenzierung, Morphologie und Metabolismus regulieren. Obwohl die MV-Bindung an T-Zellen nicht zur Apoptose führt, interferiert damit die MV-induzierte Inhibition der Akt-Kinase mit essentiellen Signalwegen.

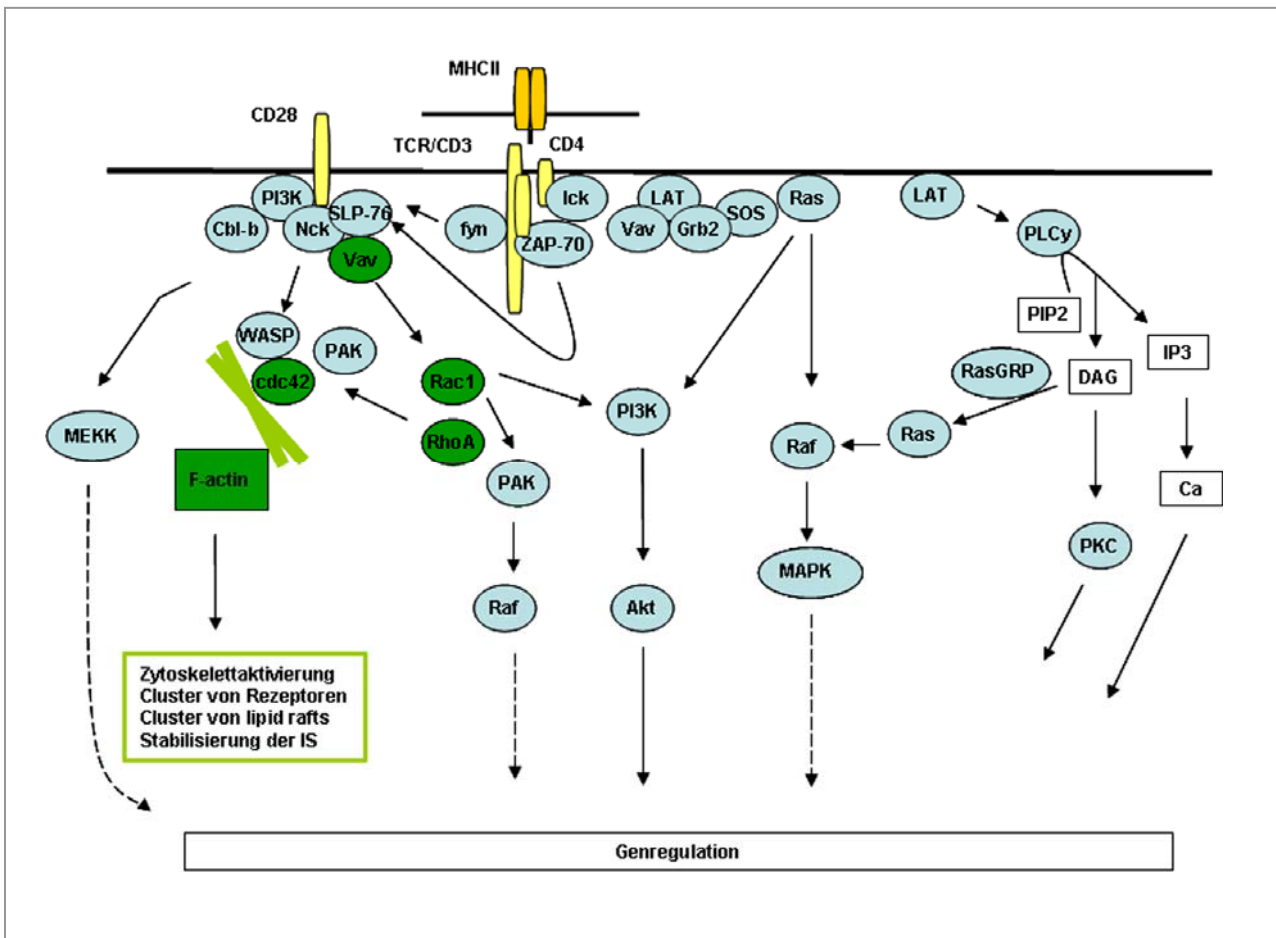
Es wurde gezeigt, dass MV direkt mit spezialisierten Bereichen der T-Zell-Membran (Glykosphingolipid-reiche Domänen, Membran-rafts) interagiert (96), was eine Veränderung der Rekrutierung und Aktivierung wichtiger TCR-Signalkomponenten zur Folge hat. Die Bindung von MV interferiert mit der TCR-stimulierten Tyrosin-Phosphorylierung und Calcium-Mobilisierung erst 24 Stunden nach Viruskontakt. Dagegen ist bereits eine kurzzeitige Behandlung mit MV ausreichend, um den Transport PH-Domänen-enthaltender Proteine, der Akt-Kinase und Guaninnukleotid-Austauschfaktors Vav in Membran-rafts inhibieren. Obwohl die TCR-stimulierte Tyrosin-Phosphorylierung der p85-regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase p85 nach kurzzeitiger Behandlung mit MV nicht verändert ist, assoziiert die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase nicht mit Membran-rafts-enthaltenen Fraktionen. Vermutlich wird durch den Kontakt von MV der Transport dieses Proteins gestört. Cbl-b ist ein Negativregulator der PI3-Kinase, dessen CD28-abhängige Degradierung für den Transport der PI3-Kinase wichtig ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von MV an Membran-raft die Rekrutierung der PI3-Kinase verhindert, indem die TCR-stimulierte Degradierung des Negativregulators Cbl-b verhindert wird und nachfolgend die Aktivierung der PI3-Kinase und davon abhängiger Signalkomponenten (96). Da in den oben genannten Untersuchung mit primären humanen T-Zellen gezeigt wurde, dass die MV Rezeptoren CD46 und CD150 nicht involviert sind, könnten MV vermutlich durch Interaktion mit einem bis jetzt unbekanntem Rezeptor in Membran-raft wichtige T-Zell-Signalwege verändern (96) und damit die Inhibition der T-Zell-Proliferation induzieren. Diesen Befund unterstützen Untersuchungen, bei denen die Viruskontakt-vermittelte Proliferationsinhibition durch

Verwendung von SLAM oder CD46 negativer Zelllinien und in Gegenwart von Antikörpern gegen beide Rezeptoren nicht hemmbar ist (47,62).

1.3. Bedeutung von molekulare Motoren in der Dynamik von T-Zell-Aktivierung

1.3.1. T-Zell-Aktivierung

T-Zell-Rezeptor (TCR) Stimulation und gleichzeitige Costimulation (z.B. CD28) führt zur Aktin-Polymerisierung an der Kontaktzone zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle. Proximale Ereignisse, die der TCR-Aktivierung unmittelbar folgen beinhalten die Aktivierung von Proteinkinasen und Phosphorylierung von Zielproteine und die Bildung von Proteinkomplexen, welche Adaptormoleküle und Enzyme enthalten (97-99). Diese initialen Signale resultieren in der Aktivierung von Signalkaskaden, die in Transkription Proliferations- und Differenzierungs-relevanter Gene involviert sind (**Schema 1.3.**). Die Ligation des TCR aktiviert verschiedene Protein-Tyrosin-Kinasen, welche das integrale Membranadapterprotein LAT (*linker for activation of T cells*) phosphorylieren. Nach der Phosphorylierung wirkt das Molekül als Bindungsstelle für Adaptormoleküle, z.B. die SH2-Domäne enthaltenden Adaptormoleküle Grb2 und SLP-76 (99,100). Diesen drei Proteine assoziieren mit Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), die dadurch aktiviert wird (97). Grb2 aktiviert den Austauschfaktor SOS, welcher Ras und somit die MAP-Kinase Signalwege aktiviert. Besonders für die Zytoskelettaktivierung von Bedeutung ist, dass SLP-76 den Guanin-nukleotid-Austauschfaktor Vav (*guanine nucleotide-exchange factor*) und das Adaptorprotein Nck binden kann. Nck wiederum interagiert mit WASp und bringt vermutlich die Maschinerie zur Aktinpolymerisierung an die Membran. WASp (*Wiskott-Aldrich-syndrome protein*) ist ein Multidomänenkomplex aus Adaptormolekülen, der unter anderem eine Bindungsstelle für Aktin besitzt (101,102). Vav aktiviert die Rho Familie der kleinen GTPasen, durch deren Bindung WASp aktiviert wird.



Schema 1.3.: Vereinfachtes Schema über TCR-vermittelte Signale. T-Zell-Aktivierung erfordert TCR-vermittelte Signale und Costimulation und induziert die Aktivierung diverser Signalwege, die die Veränderung der Gentranskription (z.B. IL-2, NF- κ B) regulieren. Erkennen die TCR und die CD4-Moleküle das über den MHCII-Komplex präsentierte antigene Peptid, führt das zur Tyrosin-Phosphorylierung in der ITAM-Domäne des CD3-Komplexes. Dieses dient dann als Bindungsstelle der durch die Lck-Kinase phosphorylierten Zap-70 Kinase, und anschließend wird an multiplen Tyrosin-Resten das Adaptorprotein LAT phosphoryliert. Das führt zur Rekrutierung von LAT-assoziierten Proteinen, wie Grb2, Gads, PLC γ , PI3-Kinase und der Ras-GTP-Austauschfaktor SOS. Das Adaptorprotein SLP-76 wird durch die Assoziation mit Gads und PLC γ zu diesem Komplex rekrutiert und führt letztendlich zur Aktivierung des Ras-MAP-Kinase Signalweges und zur Calcium-Freisetzung. Des weiteren dient SLP-76 als Verbindung für die Rekrutierung weiterer Signalproteine wie PLC γ , dem Vav Nukleotidaustauschfaktor der Rho GTPasen und dem Adaptor Nck. Cbl, ein Adaptor und Ubiquitinligase assoziiert mit LAT über einen noch unbekanntem Mechanismus. Zusätzlich zur transkriptionellen Veränderung wird durch Antigenrezeptorstimulation über den Vav-Rho GTPasen-WASp-abhängigen Signalweg die Veränderungen des Zytoskeletts und Clusterbildung von Rezeptormolekülen kontrolliert.

Rho GTPasen (Cdc42, Rac1 und RhoA) sind kritische Mediatoren der Zytoskelettaktivierung und -reorganisation (97,103). Die durch die Costimulation induzierte Umlagerung des F-Aktins ist kritisch für die Konzentration von Rezeptormolekülen und Stabilisierung der

immunologischen Synapse, welche wiederum für prolongierte T-Zell-Signale und Proliferation essentiell ist.

1.3.2. F-Aktin: der Hauptbestandteil des zellulären Zytoskeletts

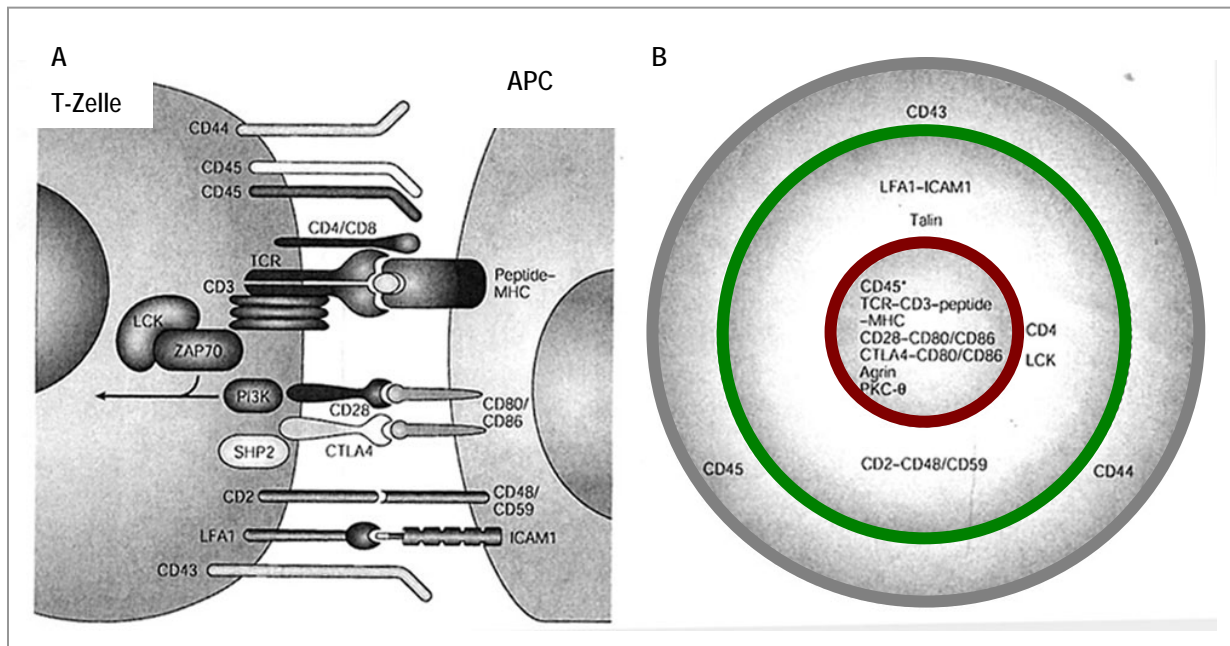
Das zelluläre Zytoskelett wird von Aktin-Mikrofilamenten, Myosin-intermediären Filamenten und Bündeln von Mikrotubulin organisiert (97). Durch biochemische und mechanische Stimulation kommt es zu schnellen dynamischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts. Monomeres globuläres (G-) Aktin polymerisiert zu filamentösen (F-) Aktin (Mikrofilamente), welche aus Fasern von Aktin-Monomeren bestehen, welche zu Bündeln aus filamentösen Aktin und höher geordneten Strukturen zusammengeführt werden. Die corticalen Aktin-Filamente sind über Linkerproteine mit der Plasmamembran verbunden und bestimmen Zellform, Bewegung und Bildung von Filopodien und Lamellipodien. T-Zell-Aktivierung induziert die funktionelle Veränderungen in Zellform und Zytoskelettarchitektur. Die Verwendung von Inhibitoren, infolge derer die Polymerisierung des F-Aktins blockiert und die TCR-vermittelte Signale beendet wurde, demonstriert die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für die Aktivierung von T-Zellen (104,105). Die Ligation des T-Zell-Rezeptors führt zur Aktin-Polymerisierung, welche für die Formation von ausgedehnten Kontakten zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender-Zelle erforderlich ist. Weiterhin kann polymerisiertes F-Aktin als Linker zur Zusammenführung und Stabilisierung von Signalkomplexen dienen (106).

Um schnelle Veränderungen der Zellform zu ermöglichen, die z.B. während der Migration von Lymphozyten auftreten, sind Prozesse zur Polymerisierung und Depolymerisierung von F-Aktin sehr wichtig. Verantwortlich dafür sind Proteine mit Aktin-Depolymerisierungsaktivität, wie das ubiquitär exprimierte Cofilin, das zur Familie der kleinen Aktin-bindenden Proteine gehört (101). Cofilin ist durch Phosphorylierung an einen Serinrest in Position 3 inhibiert. Sowohl LIM-Kinase 1 und 2 (LIMK1/2), Rho-Kinase, als auch die Testis-spezifische Proteinkinase 1 und 2 (TESK 1/2) können Cofilin durch Phosphorylierung inaktivieren (107-110). Die Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A (Okadaiksäure-sensitive, Cyclosporin A-resistente Phosphatasen vom Typ 1 und Typ 2A) oder die Phosphatase *slingshot* (SSH) können mit Cofilin assoziieren und durch Dephosphorylierung aktivieren (101,111,112). Die Aktivierung und Bindung von Cofilin an F-Aktin induziert die

Polymerisierung als auch Depolymerisierung von F-Aktin, wodurch neue Aktin-Monomere generiert werden (101).

1.3.3. Die immunologische Synapse

Die Erkennung antigener Peptide, welche von MHC-Molekülen auf Antigen-präsentierende Zellen (APC) präsentiert werden, durch den TCR/CD3-Komplex führt zur T-Zell-Stimulation (**Schema 1.4.**). Allerdings erfordert eine vollständige Aktivierung zusätzliche Signale (Costimulation), die aus der Interaktion von Rezeptoren (z.B. CD2 und CD28) auf T-Zellen mit ihren Liganden (CD58, CD80, CD86) auf APC resultieren (97,113). Dagegen führt die Ligation des TCR/CD3 ohne gleichzeitige Costimulation zur Anergie oder zur Apoptose (114). T-Zellen tragen ~30.000 bis 40.000 TCR auf der Oberfläche, aber nur 50-100 MHC/Peptidkomplexe auf der APC sind für die T-Zell-Proliferation notwendig (113,115). Die Ligation des TCR in Gegenwart von Costimulation induziert die Formation der immunologischen Synapse, welche ein organisierter Zusammenbau von Antigen-Rezeptor-Cluster, Adhäsionsmolekülen, Co-Rezeptoren, Membran-rafts und intrazellulären Molekülen ist, welche an der Stelle der Rezeptorligation lokalisiert sind (**Schema 1.4.A**). Membran-rafts sind spezialisierte Cholesterol-, Glykosphingolipid-, und Shingomyelin-reiche Membrankomponenten. Diese zu Membransubdomänen organisierten Bereiche enthalten Signalproteine, wie z.B. Tyrosinkinasen, Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine (z.B. CD55, CD58 und CD59) und Adaptormoleküle (LAT), welche als Plattform für die Bildung von Signalmultikomplexen fungieren können (116). An der Kontaktstelle zwischen APC und T-Zelle bilden sich strukturell hoch organisierte Strukturen aus, die als SMAC (*small supramolecular activation complex*) bezeichnet werden. Die Formation von SMAC sind relativ späte Ereignisse in der TCR-Aktivierung und hängen von einem funktionellem Aktinmyosin-Zytoskelett ab. Eine reife immunologische Synapse besteht aus drei Domänen: einer zentralen (cSMAC), einer peripheren (pSMAC) und einer distalen SMAC (dSMAC). **Schema 1.4.B** illustriert, dass die zentralen Cluster TCR, CD3, Lck, Fyn, PKC θ , CD2 und CD28 enthalten, die periphere Domäne LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*) und Talin. Große glykosylierte Moleküle, wie die Protein-Tyrosin-Phosphatasen CD43 und CD45 sind im distalen Bereich außerhalb der pSMAC lokalisiert (dSMAC).



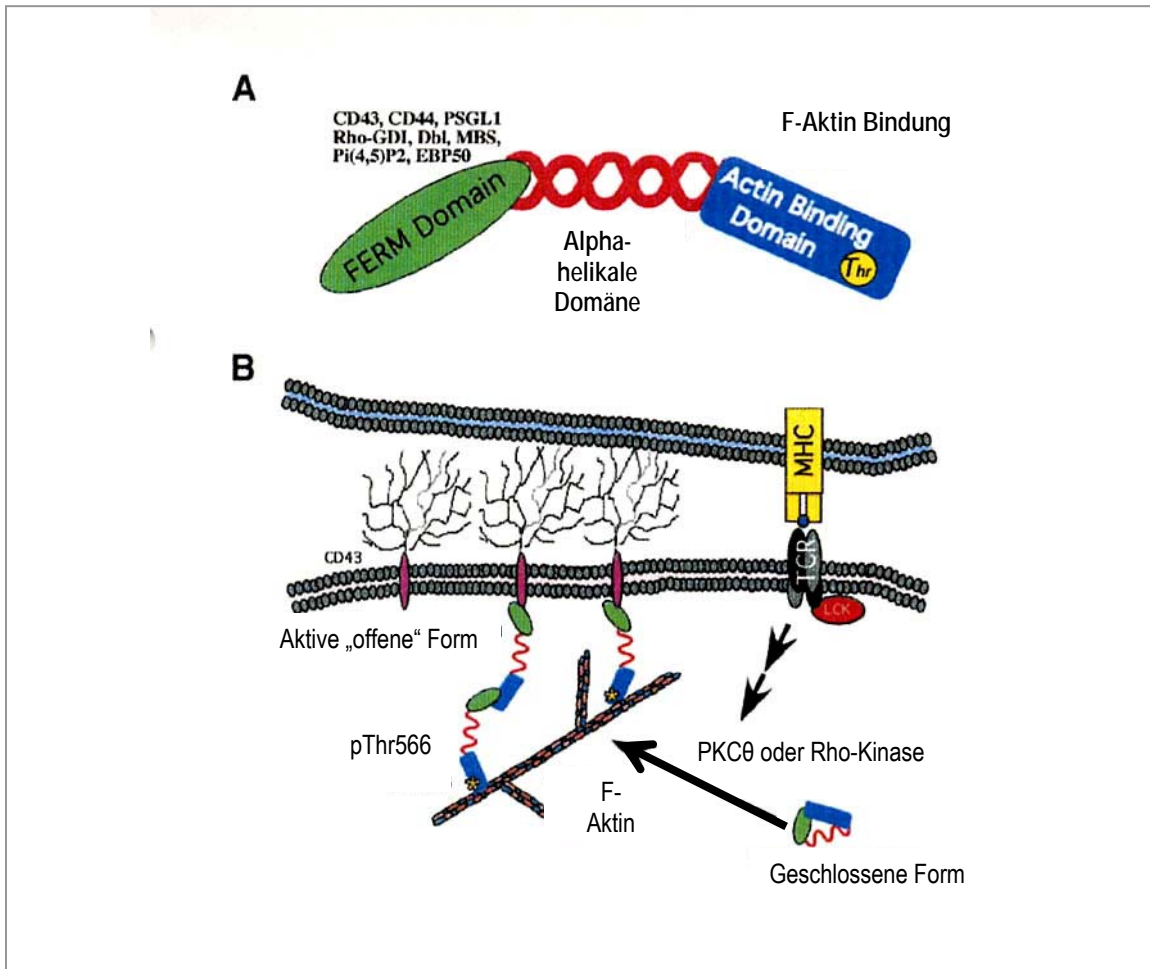
Schema 1.4.: Reife immunologische Synapse zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle. (A) Die Seitenansicht zeigt eine Auswahl von Ligandenpaaren und Signalmolekülen, welche in die TCR Erkennung involviert sind. Der Pfeil zeigt den Signalweg der zur T-Zell-Aktivierung führt. (B) Die Aufsicht auf die synaptische Kontaktzone zeigt die charakteristische SMAC-Organisation: cSMAC (rot), pSMAC (grün) und dSMAC (grau). Die zentrale cSMAC-Domäne enthält u.a. den TCR-Komplex, CD2 und CD28, in der pSMAC-Zone sind das Integrin LFA-1, das an ICAM-1 auf der APC bindet und das Zytoskelettprotein Talin stark konzentriert. Große glykolysierte Proteine wie CD43 und CD45 werden aus der Synapse heraus geschoben und befinden sich im distalen Bereich dSMAC. (Verändert nach: Huppa & Davis, 2003,113)

Die Funktion der immunologischen Synapse ist noch nicht vollständig geklärt. In früheren Studien zur Dynamik und Struktur der IS wurde vermutet, dass deren Funktion in einer Verstärkung und Unterstützung von Signalen besteht (97,105). Da die proximalen Signale des TCR vor Ausbildung einer reifen IS am höchsten sind, wurde die Idee favorisiert, dass die IS auch in die Herunterregulation und Endozytose des T-Zell-Rezeptors involviert ist und Signale und Degradation des TCR balanciert (102,117,118). Andere Studien lassen vermuten, dass reife T-Zell-Synapsen nicht strikt erforderlich für eine T-Zell-Proliferation sind, aber sie regulieren diesen Prozess und könnten komplexe Signalwege koordinieren (119). Vermutlich stabilisiert die immunologische Synapse ligierte TCR Moleküle und damit assoziierte Proteine und unterstützt somit eine effiziente T-Zell-Aktivierung (120-123). Aktin-abhängige Rekrutierung von TCR Komplexen und Clusterbildung von Rezeptoren ermöglichen die Organisation von höher geordneten Strukturen und Cluster von Signalmolekülen, die

Signalmoleküle und Adapterproteine konzentriert und negative Regulatoren, wie CD45 ausschließt, und damit in effektive TCR Signale und Lymphozyten-Aktivierung resultieren (97,118,124). Die IS könnte eine Plattform darstellen, die die architektonische Komplexität zur Unterstützung regulatorischer Mechanismen, die erforderlich sind, um die T-Zell-Aktivierung im Zusammenhang mit ihrer Funktion, die Art der involvierten Antigen-präsentierenden Zellen (DC und B-Zellen), als auch die Qualität und Quantität der zu erkennenden TCR Liganden zu leiten (113, 125-128). Befunde von Synapse, die sehr lange bestehen, aber auch von nur kurzfristig bestehenden Synapsen, unterstützen diese Hypothese (115).

1.3.4. Membran-Zytoskelett-Interaktionen

Ezrin, **Radixin** und **Moesin**, die kollektiv als ERM-Proteine bezeichnet werden, gehören zu einer „Band 4.1“ Superfamilie von Proteinen, basierend auf ihrer hohen Homologie zur Amino-terminalen Domäne des „Band 4.1“-Proteins von Erythrozyten (129). Diese Proteine kontrollieren die Verankerung von einigen Membranproteinen mit dem Aktin-Zytoskelett und damit die Zellform, Zelladhäsion und Zytokinese. Zusätzlich sind ERM-Proteine in intrazelluläre Signale involviert. Alle ERM-Proteine haben eine N-terminale homologe Domäne von etwa 300 Aminosäuren gemeinsam, die FERM Domäne (**F**ür: **E**zrin, **R**adixin, **M**oesin), eine alpha-helikale Linkerregion und einer C-terminalen Aktin-bindenden Domäne (129) (**Schema 1.5**). Die Proteine existieren in zwei Konformationen: einer geschlossenen Konformation, bei der N- und C-Terminus durch Interaktion im gefalteten Zustand gehalten werden, und einem zweiten aktivem, offenem Zustand, bei der die intramolekulare Interaktion freigesetzt wird und die Membranrezeptoren mit dem Zytoskelett verbunden werden. Die intramolekulare Assoziation zwischen der FERM-Domäne und C-terminalen Domäne wurde kürzlich durch Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt (129).



Schema 1.5.: Funktionelle Organisation und Aktivierung von ERM-Proteinen.

(A) Domänenstruktur der ERM-Proteine. Die N-terminale FERM-Domäne (grün) ist eine funktionelle Domäne, die mit Membrankomponenten, Phospholipiden und verschiedenen Signalmolekülen interagieren kann, die C-terminale Aktin-bindende Domäne (blau) wird am Threoninrest (Thr, gelb) phosphoryliert, verbunden werden die Domänen durch eine alpha-helikale Region (rot). (B) ERM-Proteine werden durch konformationelle Änderungen reguliert. Der Hauptteil der ERM-Proteine liegt in einer inaktiven, geschlossenen Konformation vor, bei der die FERM-Domäne mit der Aktin-bindenden Domäne interagiert. Phosphorylierung am Threoninrest durch PKC θ oder Rho-Kinase und Bindung von PIP₂ induzieren und stabilisieren die offene aktive Konformation, die eine Verbindung der FERM-Domäne mit Transmembranproteinen und der Aktin-bindenden Domäne mit dem F-Aktin-Zytoskelett ermöglicht. (Verändert nach: Cullinan *et al.* 2002, 131)

In der offenen Konformation können ERM-Proteine auch Homo- oder Heterooligomere bilden, so dass die FERM-Domäne eines ERM-Proteins mit der C-terminalen Aktin-bindenden Domäne eines weiteren ERM-Proteins binden kann. Die Aktivierung der ERM-Proteine wird mehrheitlich durch Phosphorylierung an einem C-terminalen Threonin-Rest

(Thr558 in Moesin, Thr567 in Ezrin und Thr564 in Radixin) in der Aktin-bindenden Domäne reguliert. *In vitro* kann Proteinkinase (PK θ) θ und Rho-Kinase den Threonin-Rest in T-Zellen phosphorylieren. ERM-Proteine können überdies durch Bindung von PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) an die FERM-Domäne aktiviert werden (129). Infolge der TCR-Ligation werden ERM-Proteine phosphoryliert und sind in der immunologischen Synapse lokalisiert (129). ERM-Proteine sind in einem trimolekularen Komplex zusammen mit einem Membran-raft-ständigen Csk-bindenden Protein (CBP), dem Ezrin-bindenden Phosphoprotein EBP50 gebunden. Vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass die Ligation des TCR die Entkopplung von CBP aus dem EBP50-ERM-Komplex induzieren kann. Da der trimolekulare Prozess unter TCR Stimulation freigesetzt wird, können ERM-Proteine vermutlich die Clusterbildung von TCR und Membran-rafts kontrollieren, indem sie das unkontrollierte Aktivieren in Abwesenheit von Stimulation verhindern bzw. die Stimulation unterstützen können (117.). Durch das simultane Assoziieren von Membrankomponenten und Aktin-filamenten können ERM-Proteine die Clusterbildung des TCR und die Bildung der IS unterstützen. Eine Vielzahl von intrazellulären Signalkomponenten können mit ERM-Proteinen interagieren. Die Mehrheit der Proteine bindet an die N-terminale FERM-Domäne, einige zytosolische Proteine, wie Proteinkinase A, können aber auch mit der alpha-helikalen Domäne interagieren (130). Die FERM-Domäne kann direkt positiv geladene Aminosäuren in zytoplasmatischen Regionen von Transmembranproteinen (z.B. ICAM-1,-2,-3, L-Selectin, CD43 und CD44 u.a.) binden. Zusätzlich kann die FERM-Domäne zytosolische Proteine, z.B. Rho-GDI, einem Regulator der Rho GTPasen, PI3-Kinase und der FAK (*focal adhesion kinase*) binden (130-134). Des Weiteren können ERM-Proteine Transmembran- als auch zytosolische Proteine durch das EBP50-Protein binden. Damit sind ERM-Proteine als multifunktionale Proteine, in zelluläre Architektur, intrazelluläre Signale, Membranveränderungen und Ausbildung von Mikrovilli involviert und sind somit an Prozessen beteiligt, die in Polarisierung und Migration von T-Zellen resultieren.

1.3.5. T-Zell-Migration

Zellmigration ist eine charakteristische Eigenschaft von Leukozyten. T-Zellen sind zirkulierende und sehr motile Zellen, welche eine Geschwindigkeit von 7-10 $\mu\text{m}/\text{min}$ erreichen können (135). Die Extravasation ist sowohl eine zentrale Eigenschaft von Lymphozyten die vom Blutstrom ins Gewebe emigrieren, wo sie ihre Effektorfunktion ausüben können, als auch für die normale Rezirkulation von Leukozyten durch lymphatische Organe und ist somit kritisch für ein vollständig funktionierendes Immunsystem (136). Erforderlich für Zellmotilität ist Aktin-Dynamik, Veränderung der Integrin-vermittelten Adhärenz und Modifikation in der Zellform. Bereits vor etwa 20 Jahren wurde die polarisierte Morphologie von Leukozyten beschrieben, welche aus drei Kompartimenten besteht: der führenden Front, dem Hauptkörper, der den Zellkern enthält und dem distalem Pol, der als Uropod bezeichnet wird (137,138). Der Uropod ist eine Pseudopod-ähnliche Projektion, die als spezialisierte Struktur für die Motilität und adhäsive Funktion wichtig ist (135) **Abb. 1.1.** zeigt anhand eines Beispiels einer T-Zelle die polarisierte Morphologie.

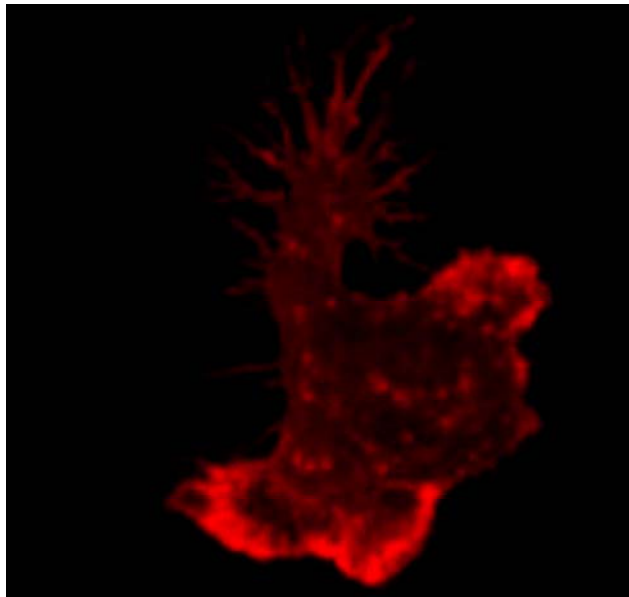
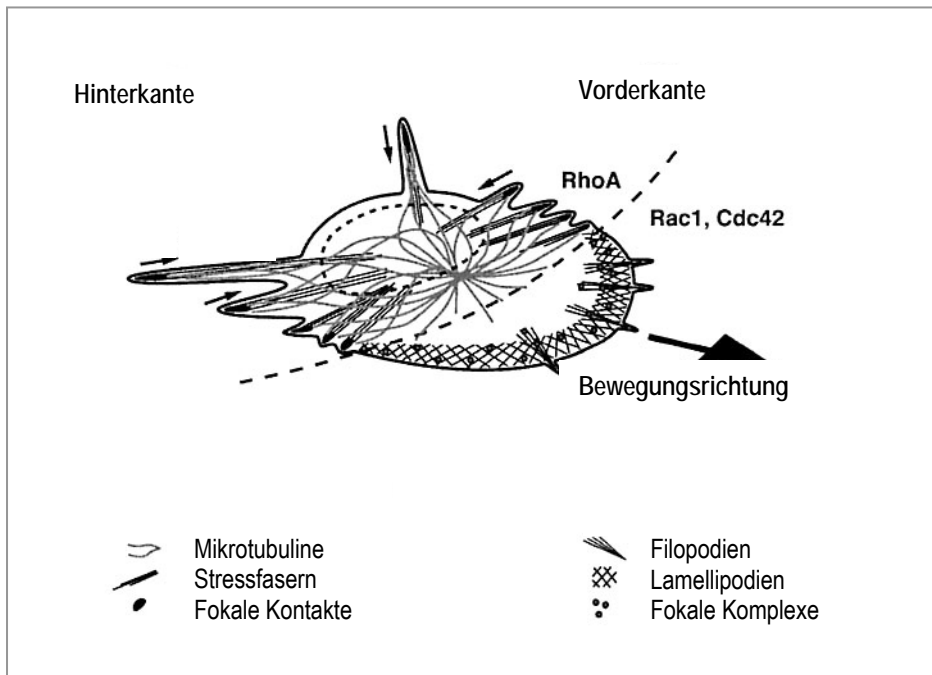


Abb. 1.1.: Beispiel für die polarisierte Struktur einer F-Aktin gefärbten T-Zelle. Primäre humane T-Zellen wurden mit costimulatorischen Antikörpern aktiviert, fixiert, permeabilisiert und mit Phalloidin-Alexa594 das F-Aktin gefärbt. Zu erkennen ist die F-Aktin reiche Lamellipodien-Struktur an der Vorderkante und dem distalen Uropod, welcher die Zelle vorwärtsbewegt.

Der Migration geht eine Polarisierung der Leukozyten voraus, die durch Chemokine induziert wird (135). Das führt zur Änderung der Verteilung der radialen Symmetrie von filamentösen F-Aktin zu einer Konzentration an definierten Regionen, wodurch sich die Morphologie zu einer polarisierten Zellform verändert (135). Der Uropod, in dem Adhäsionsmoleküle (ICAM-1,-2,-3), ERM-Proteine, Zytoskelettproteine, CD43 und CD44 akkumuliert sind, ist wichtig für die Adhäsion und unterstützt die Zellmigration. (139). Chemokinrezeptoren, Integrine, Zytoskelettproteine und regulatorische Proteine verändern während der Polarisierung ihre Lokalisation. Leukozyten-Polarisierung findet während verschiedener Zell-Zell-Interaktionen statt, z. B. Bindung von T-Zellen an APCs, Erkennung von Zielzellen oder der Bindung an Endothelzellen (136). Die Zellpolarisierung ist eine inhärente Eigenschaft von T-Zellen, die sich auf Antigen-präsentierende Zellen hinbewegen. Während dieses Prozesses erkennen T-Zellen APCs durch die führende Front (140). Der initiale adhäsive Kontakt führt zur Interaktion von ICAM-1 (CD54), -2 (CD102) und -3 (CD50) mit LFA-1 und ICAM-3 mit dem DC-spezifischen Adhäsionsmolekül DC-SIGN (*ICAM-3 grabbing non-integrin*)(141). Dieser Antigen-unabhängige Schritt ermöglicht das Scannen der APCs durch T-Zellen. Diesem Schritt folgt die Bindung von CD2 auf T-Zellen an LFA-3 (CD58). Diese Interaktion ermöglicht die Erkennung des Antigen-beladenen MHC-Rezeptors durch den TCR, welches ein Signal freisetzt, das die Migration der T-Zelle stoppt (142). Die Ligation von TCR/CD3, ICAM-3 und CD2 verstärkt die LFA-1/ICAM-1 Adhäsion, welche wiederum die Stärke der APC/T-Zell-Interaktion erhöht und Voraussetzung für die Ausbildung fester Kontakte zwischen T-Zellen und APC, Clusterbildung von T-Zell-Rezeptorkomplexen und costimulatorischen Molekülen ist (143).

Da die aktivierten Formen von Cdc42, Rac1 und RhoA die Polymerisierung von Filopodien, Lamellipodien und Stressfasern induzieren, sind diese GTPasen wichtige Regulatoren der Zellpolarisierung (**Schema 1.6.**) Desweiteren ist in die Polarisation und Migration eine drastische Reorientierung des Tubulin-Zytoskelettes involviert, welches zur Relokalisation des MTOC (*microtubule organizing center*) führt (144).



Schema 1.6.: Schematische Darstellung der T-Zell-Migration illustriert die Bedeutung des Zytoskeletts. An der Front induziert die Aktivierung von Rac1/Cdc42 F-Aktin reiche Lamellipodien und Filopodien, die die Zelle vorwärts treiben, gleichzeitig wird das distale Zellende durch Mikrotubuline eingezogen (Pfeile) und ermöglicht so die Vorwärtsbewegung. (Verändert nach: Wehrle-Haller & Imhof, 2002, 145)

2. Fragestellung

Vorangegangene *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass der Kontakt humaner T-Zellen mit viralen MV Glykoproteinen auf der Oberfläche infizierter Zellen oder Viruspartikeln die Mitogen-stimulierte T-Zell-Proliferation inhibiert. Es wurde demonstriert, dass der Kontakt mit dem MV Glykoproteinkomplex ausreichend ist, um intrazelluläre Signalwege in T-Zellen zu verändern und so die Proliferationshemmung zu induzieren.

Infolge des MV Kontaktes mit T-Zellen ist die Aktivierung der PI3-Kinase in TCR-stimulierten Zellen inhibiert. Damit verbunden ist der ineffiziente Transport PH-Domänen-enthaltender Proteine in Membran-rafts, wie der Akt-Kinase und Vav. Aktives Vav induziert die Aktivierung kleiner Rho GTPasen, welche eine kritische Rolle in der Regulation von Zytoskelettorganisation von T-Lymphozyten spielen. Da die Aktivierung des Zytoskelettes von essentieller Bedeutung für Rezeptorclustering und die Induktion physiologischer T-Zell-Antworten ist, und alle Stadien in der Aktivierung von Lymphozyten mit profunden Veränderungen in der Zellmorphologie assoziiert sind (Migration, Adhäsion, Bildung der IS) und von einem funktionellen Zytoskelett abhängen, sollte untersucht werden, ob der Kontakt mit viralen Glykoproteinen die Aktivität von Rho GTPasen und somit die Reorganisation von Zytoskelettkomponenten beeinflusst. In diese Prozesse involviert sind Membranlinkerproteine (ERM). Als Membran-Zytoskelettlinker verbinden ERMs F-Aktin mit der Plasmamembran und sind in dynamische Membran-/Zytoskelettinteraktionen, z.B. Bildung von Mikrovilli, involviert. Daher sollte untersucht werden, ob MV die Phosphorylierung der ERM-Proteine und die Ausbildung von Mikrovilli verändert ist. Da Umlagerungen des Zytoskeletts für die Formation der IS von großer Bedeutung sind, wurde untersucht, ob der Kontakt von T-Zellen mit MV die Bildung der IS verändert und somit eine erfolgreiche Interaktion der T-Zellen mit DCs verhindert.

In vorliegender Arbeit wird gezeigt werden, dass die Bindung von MV an die Plasmamembran von T-Zellen mit der Aktivierung wichtiger Signalwegen interferiert und damit wichtige funktionelle Eigenschaften von T-Zellen verändert, was zu drastischen Konsequenzen in der Immunantwort führen kann.

3. Material

3.1. Geräte

- Autoklaven
- Brutschrank, Nuaire
- Eismaschine
- Elektrophoreseapparatur, Western Blot Kammer und Zubehör aus institutseigener Werkstatt
- Fluoreszenzmeßgerät für Zellkulturplatten, Fluoroscant Ascent FL
- Heizblock
- Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta, Zeiss
- Laborwaage
- Magnetrührer
- Orbital Shaker
- pH-Meter
- Photometer, Eppendorf
- Pipetten, Eppendorf
- Rotator
- sterile Arbeitsbank, Nuaire
- Ultrazentrifuge, Sorvall 90 SE, Schwingrotor Surespin 630
- Wasserbad, GFL
- Zentrifugen, Eppendorf, Hettich Rotixa/P
- Elektronenmikroskop DSM 962

3.2. Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Sigma, Gibco, Serva, Merck und Amersham Biosciences bezogen.

Steriles Einwegmaterial wurde von den Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc und Hartenstein geliefert.

3.3. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien standen im Institut zur Verfügung.

Tab. 3.1: Zelllinien

| ZELLINIE | ZELLTYP | HERKUNFT |
|-----------------|--|-------------------------------------|
| Vero | Nierenfibroblastenzelllinie | Afrikanische Grüne Meerkatze (ATCC) |
| BJAB | Lymphoblastoide B-Zelllinie | Human |
| B95a | Semiadhärente EBV-B-Zelllinie | Krallenaffe (ATCC) |
| U251 | Glioblastomzelllinie | Human |
| U251p | Glioblastomzelllinie, mit MV ED persistierend infiziert | Human |

3.4. Primäre humane Zellen

Primäre Lymphozyten wurden vom Institut für Transfusionsmedizin, Würzburg als Leukaphereseblut bereitgestellt. Gemäß des in **Abschn. 4.1.5.** beschriebenen Protokolls wurden daraus T-Zellen und Monozyten isoliert und gereinigt.

3.5. Virusstämme

MV ED und WTF waren im Labor vorhanden und wurden entsprechend der im Methodenteil aufgeführten Bedingungen passagiert und getestet.

Tab. 3.2: Virusstämme

| VIRUS | TYP | HERKUNFT |
|--------------|------------------------------------|-----------------|
| ED | Attenuierter Impfstamm Edmonston B | Impfstamm/60 |
| WTF | Wildtyp | Erlangen 1990 |

3.6. Medien und Lösungen

Alle Medien, ATV und PBS stammen aus der hauseigenen Medienküche. Das fetale Kälberserum (FKS) war von der Firma Biochrom und wurde vor der Verwendung 30 min zur Inaktivierung des Komplements bei 54°C erhitzt. Das Antibiotikum Cibrobay wurde von Bayer bezogen.

RPMI

RPMI 1640

2 mM L-Glutamin

100 IE/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

10 % FKS

MEM

MEM

2 mM L-Glutamin

100 IE/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

5 % FKS

ATV

0.05 % w/v Trypsin

0.8 % w/v NaCl

0.04 % w/v KCl

0.1 % w/v D-Glukose
0.058 % w/v NaHCO₃
0.02 % w/v EDTA

Einfriermedium

90 % FKS
10 % DMSO

NTE-Puffer für die Virusreinigung

1 x NTE

100 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM Tris pH 7.4

Saccharoselösungen

25 % w/v Saccharose in NTE
30 % w/v Saccharose in NTE
54 % w/v Saccharose in NTE
60 % w/v Saccharose in NTE

Leukapherese

Alsevers

8.0 g/l w/v Natriumcitrat, pH 6.1
0.55 g/l w/v Zitronensäure
4.2 g/l w/v NaCl
20.5 g/l w/v D-Glukose

AET

2 % w/v AET in ddH₂O, pH 9.0

Herstellung der AET-SRBC-Lösung

10 Flaschen SRBC wurden in 50 ml Röhrchen zentrifugiert (2000 rpm, 7 min, RT), anschließend wurden je vier Pellets in Alsevers resuspendiert, mit Alsevers auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (2000 rpm, 7 min, RT). Das SRBC-Pellet wurde mit AET-Lösung versetzt und für 20 min im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die SRBC-Lösung mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm, 10 min, RT). Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die gewaschenen Pellets, je ca. 2 ml SRBC-Lösung, wurden in 48 ml RPMI/10 % FKS resuspendiert, wodurch sich eine 4 %ige AET-SRBC-Lösung ergibt. Die Lösungen wurden bis zum Verbrauch bei 4°C aufbewahrt und vor jeder Leukapherese frisch angesetzt.

Erythrozyten-Lyse-Puffer

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0.1 mM EDTA

Percoll-Dichtegradient

Ein Percoll-Dichtegradient wurde mit Percoll einer Stammkonzentration von 1,129 g/ml (von der Firma Amersham Biosciences) nach folgendem Schema hergestellt:

für 10 ml 1.076 g/ml: 1 ml 1.5 M NaCl + 5.442 ml Percoll + 3.558 ml aqua dest.

für 10 ml 1.059 g/ml: 1 ml 1.5 M NaCl + 4.124 ml Percoll + 4.876 ml aqua dest.

für 10 ml 1.045 g/ml: 1 ml 1.5 M NaCl + 3.039 ml Percoll + 5.961 ml aqua dest.

3.7. Western Blot

Blockierungspuffer

3 % w/v BSA in PBS

5 % w/v fettarmes Milchpulver in PBS/0.05 % Tween-20

Waschpuffer

PBS/0.05 % Tween-20

Puffer für die Inkubation mit Primärantikörper

3 % w/v BSA in PBS/0.05 % Tween-20

Puffer für die Inkubation mit Sekundärantikörper

5 % w/v fettarmes Milchpulver in PBS/0.05 % Tween-20

10 x Proteingelpuffer für 1 l:

30.0 g Tris pH 8.7

144 g Glycin

10 g SDS

Kathodenpuffer für 1 l:

3.0 g Tris pH 9.4

5.2 g Hexansäure

20 % v/v Methanol

30mM Anodenpuffer für 1 l:

3.6 g Tris pH 10.4

20 % v/v Methanol

300 mM Anodenpuffer für 1 l:

36 g Tris pH 10.4

20 % v/v Methanol

APS

10 % w/v in aqua dest.

SDS

20 % w/v in aqua dest.

Ladepuffer für SDS-PAGE Gele

200 mM Tris pH 6.8

4 % w/v SDS

20 % w/v Glycerol

0.02 % w/v Bromphenolblau

200 mM DTT

Proteinstandard

Größenstandard für WB, Fermentas

Film

Super X-ray-Röntgenfilm, Fuji

Nitrozellulosemembran

Transfermembran Protran®, Schleicher & Schuell

Chemilumineszenzsubstrat

ECL von Amersham Biosciences

3.8. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Test (Sigma) durchgeführt. Lösung I (Bicistronische Säure) wurde mit Lösung II (Kupfer-II-Sulfat) im Verhältnis 1:50 gemischt. 5 µl der Probe wurden zu 995 µl BCA-Lösung gegeben, ebenso 5 µl einer Standardproteinlösung und 1 Leerwert aus BCA-Lösung. Die BCA-Proben wurden für 15 min bei 60°C inkubiert, anschließend in Einmalküvetten gefüllt und die optische Dichte des entstandenen Farbstoffes bei 562 nm einem Eppendorf-Photometer mit integrierter Standardkurve gemessen.

3.9. Immunfluoreszenzfärbungen

LabTekII™ chamber slides von Nunc

3.7 % w/v Paraformaldehyd in PBS

0.01 % Triton-X100 in PBS

Blockierungspuffer 5 % w/v BSA in PBS, 0.02 % NaN₃

Färbepuffer 1 % w/v BSA in PBS, 0.01 % NaN₃

Eindeckmedium Fluorochrom G, Southern Biotech

PHEMO-Fixierung

2-fach PHEMO-Fix-Lösung:

7.4 % w/v Paraformaldehyd, 0.1 % v/v Glutaraldehyd, 1.0 % Triton-X100, der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 6.9 eingestellt

2-fach PHEMO-Puffer:

136 mM PIPES, 50 mM Hepes, 30 mM EGTA, 6 mM MgCl₂, 20 % v/v DMSO, der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 6.9 eingestellt

PHEMO-Fix und -Puffer wurden als Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde 1-fach PHEMO-Puffer hergestellt und 2-fach PHEMO-Fix mit 2-fach PHEMO-Puffer 1:2 verdünnt.

3.10. Antikörper

Nachfolgend ist die Herkunft der verwendeten Antikörper für T-Zell-Stimulation, Immunfluoreszenzfärbungen und WB Analyse aufgeführt.

Tab. 3.3: Antikörper für T-Zell-Stimulation

| ANTIKÖRPER | HERKUNFT | KLON |
|----------------------|---------------------------|--------------------|
| Ziege Anti-Mause IgG | Dianova | --- |
| Maus Anti-Human CD3 | BD Biosciences Pharmingen | Monoklonal, UCHT-1 |
| Maus Anti-Human CD28 | BD Biosciences Pharmingen | Monoklonal, CD28.2 |

Tab. 3.4: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

| ANTIKÖRPER | HERKUNFT | KLON | VERD. |
|-----------------------------------|----------------------|---|--------|
| Kaninchen Anti-Rac1 | Santa Cruz | C-14 | 1:50 |
| Kaninchen Anti-Cdc42 | Santa Cruz | P1 | 1:50 |
| Kaninchen Anti-RhoA | Santa Cruz | 26C4 | 1:200 |
| Maus Anti-CD3 ζ (TCR) | Santa Cruz | 6B10.2 | 1:200 |
| Humanes MV Serum | Würzburg, Diagnostik | 23.312/02 | 1:1000 |
| Kaninchen Anti-P-Cofilin | Cell Signalling | Ser567/Thr564/ Thr558 | 1:50 |
| Kaninchen Anti-P-ERM | Cell Signalling | | 1:50 |
| Maus Anti-Human α -Tubulin | Sigma | DM1A | 1:500 |
| Cholera toxin-Alexa 594 | Molecular Probes | Subunit B (CT-B) | 1:100 |
| Phalloidin-Alexa 594 | Molecular Probes | Phallotoxin aus: <i>Aminita phalloides</i> | 1:40 |
| Ziege Anti-Kaninchen Alexa 488 | Molecular Probes | | 1:200 |
| Ziege Anti-Maus Alexa 488 | Molecular Probes | | 1:200 |
| Ziege Anti-Human Cy2 | Dianova | | 1:500 |
| Ziege Anti-Human Cy3 | Dianova | | 1:500 |

Tab. 3.5: Antikörper für Western Blot Analyse

| ANTIKÖRPER | HERKUNFT | VERD. |
|---------------------|---|-------|
| Kaninchen Anti-MV H | Peptidserum gegen die zytoplasmatische Domäne des H-Proteins (Eurogetec) | 1:250 |

| | | |
|--------------------------|---|----------|
| Maus Anti-Moesin | Hybridomüberstand Klon 38/87 (von J. Schneider-Schaulies, Virologie, Würzburg bereitgestellt) | 1:50 |
| Kaninchen Anti-P-ERM | Cell Signaling | 1:1000 |
| Kaninchen Anti-P-Cofilin | Cell Signaling | 1:1000 |
| Kaninchen Anti-Cofilin | Cell Signaling | 1:1000 |
| Ziege Anti-Kaninchen HRP | MBI Fermentas | 1:2000 |
| Ziege Anti-Maus HRP | Dianova | 1:10 000 |

3.11. Beschichtung von Objektträgern und Platten

0.01 % v/v Poly-L-Lysin in aqua dest., Sigma

1 mg/ml humanes Plasmafibronektin in PBS, Sigma

1 mg/ml ICAM-1/Fc (Met 1 – Glu 480) in aqua dest., R&D Systems

3.12. «Kits»

Transfektionskit Nucleofector® von Amaxa

Cdc42/Rac1/RhoA *pull down* Assay von Perbio PIERCE

3.13. Fusionsinhibitor (FIP)

Z-D-Phe-Phe-Gly-OH 200 µM in DMSO, Bachem

3.14. Verschiedenes

- 100 U/µl IL-4, Promocell

- 100 U/ μ l GM-CSF, Leukine, Berlex
- 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS), Sigma
- *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A (SEA, 100 μ g/ml) und B (SEB, 250 μ g/ml), Sigma
- Schaferythrozyten (SRBC), Virion

Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitorcocktail, 1 Tablette in 25 ml Lysepuffer, von Roche

4. Methoden

4.1. Zellbiologische Methoden

4.1.1. Kultur von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden in MEM/5 % FKS kultiviert, zweimal pro Woche mit 10 ml 37°C warmen ATV von der Kulturflasche abgelöst, in frischem Kulturmedium resuspendiert und 1:5 verdünnt in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

4.1.2. Kultur von BJAB-Zellen

BJAB-Zellen wurden in RPMI/10 % FKS kultiviert. Zum Teilen der Zellen wurden diese zweimal pro Woche zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 24°C), der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und 1:10 auf neue Kulturflaschen verteilt.

4.1.3. Kultur von B95a-Zellen

B95a-Zellen wurden in RPMI/5 % FKS kultiviert und einmal pro Woche durch warmes ATV von der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert und 1:10 auf neue Kulturflaschen verteilt.

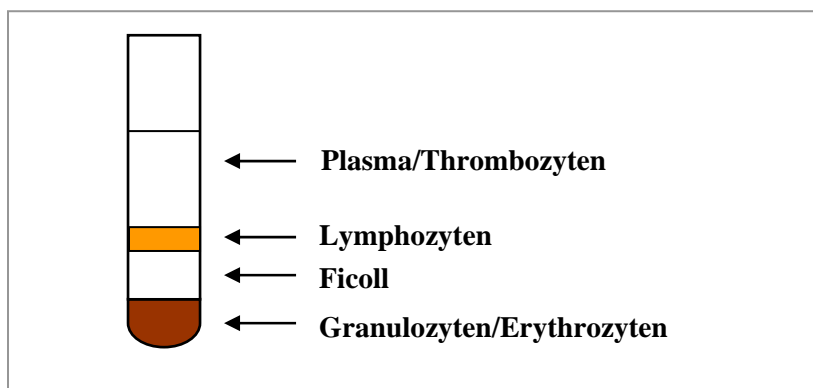
4.1.4. Kultur von U251-Zellen

U251-Zellen wurden in RPMI/5 % FKS kultiviert und zweimal pro Woche durch warmes ATV von der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert und 1:10 in neue Kulturflaschen geteilt. Mit ED persistierend-infizierte U251p-Zellen wurden einmal pro Woche durch warmes ATV von der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert und 1:5 in neue Kulturflaschen verteilt.

4.1.5. Reinigung von primären humanen Lymphozyten mittels Leukapherese

Isolierung von PBMC

Bei der Isolation von peripheren Blutlymphozyten durch Zentrifugation über einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten, wird die Trennung von mononukleären Zellen und anderen Komponenten des Blutes aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte genutzt. Aufgrund höherer Dichte lagern sich Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten (basophile, eosinophile und neutrophile Zellen) und Granulozyten im Zentrifugationsrückstand als Pellet an. Die weniger dichten mononukleären Zellen (PBMC) wie Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), NK-Zellen und Monozyten sammeln sich als Interphase oberhalb der Ficollschicht (**Schema 4.1.**).

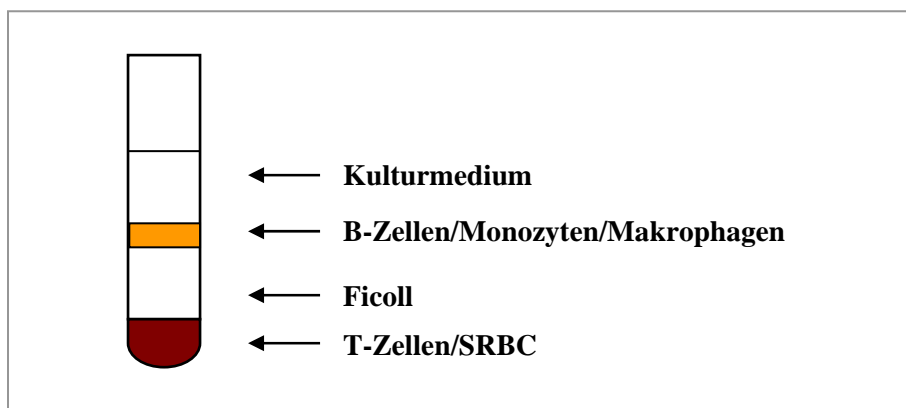


Schema 4.1.: Isolation von Blutkomponenten über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten.

Humane PBMC wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Dazu wurde heparinisiertes Blut im Verhältnis 1:2 mit Versen verdünnt und in 50 ml Röhren in Portionen von 30 ml auf 9 ml Ficoll vorsichtig überschichtet und durch Zentrifugation aufgetrennt (1200 rpm, 30 min, RT, ohne Bremse). Die Interphase oberhalb des Ficoll wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in 50 ml Röhren verteilt, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Zum Ausdünnen des mitgeführten Ficolls wurde der Waschschrift zweimal wiederholt. Vor dem letzten Waschschrift wurden 200 µl als Probe für eine FACS-Färbung und zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Circa 1/3 der PBMC wurden in kaltes Einfriermedium mit einer Zellzahl von 5×10^7 /Röhren in Einfrierboxen eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die restlichen 2/3 der PBMC-Fraktion wurden zur Isolation von Monozyten und T-Zellen eingesetzt.

Isolation von T-Zellen durch Rosettierung

Die Rosettierung beruht auf dem Prinzip, dass der CD2-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen an Schaferythrozyten bindet (SRBC=*sheep red blood cells*). Die Rosettierung separiert die Zellen in T-Zellen (E-Rosettierung-positiv) und in nicht-T-Zellen (E-Rosettierung-negativ). Dabei erhöht die Behandlung von SRBC mit 2-Aminoethylisothiuroniumhydrobromid-Lösung (=AET) die Bindung von SRBC an T-Zellen. Für die Rosettierung wurden in 50 ml Röhrchen je 13 ml 4% frisch angesetzte AET-SRBC-Lösung + 7 ml eiskaltes PBS + 30 ml PBMC-Suspension (3×10^8 PBMC) zugegeben, durch Invertieren vorsichtig durchmischt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4°C). Anschließend wurden die Pellets auf Eis gestellt und für 1 h inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurden die Pellets vorsichtig durch Rollen resuspendiert. Die Suspensionen wurden in 50 ml Röhrchen auf Ficoll überschichtet und zentrifugiert (1200 rpm, 30 min, RT).



Schema 4.2.: Isolation von SRBC über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten.

Durch die Zentrifugation sammeln sich Monozyten in der Interphase oberhalb des Ficoll. Im Pellet befinden sich T-Zellen (**Schema 4.2.**). Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in neue 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS verdünnt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Die erhaltenen Pellets (Monozyten) und die Pellets aus dem Ficoll-Gradienten (T-Zellen) wurden mit je 3 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt. Nach ca. 5 min bei RT klären sich die Lösungen und die Erythrozyten sind lysiert. Unmittelbar danach wurden die Suspensionen von Monozyten und T-Zellen getrennt in 50 ml Röhrchen vereinigt

und zum Beenden der Lyse mit RPMI/10 % FKS aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Vor dem letzten Waschschrift wurden 200 µl als Probe für eine FACS-Färbung und zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Die gereinigten T-Zellen wurden in kaltes Einfriermedium mit einer Zellzahl von 4×10^7 /Röhrchen in Einfrierboxen eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Reinigung von Monozyten

Monozyten wurden über einen diskontinuierliche Percoll-Gradienten gereinigt. Dafür wurden Percoll-Lösungen verschiedener Konzentration vorbereitet (**Abschn. 3.6.**). In Rundboden-Polypropylenröhrchen wurden 2 ml Percoll (1,045 g/ml) gegeben, welcher mittels einer langen Kanüle zuerst mit 3 ml Percoll (1,059 g/ml) und anschließend wiederum mit 3 ml Percoll (1,076 g/ml) vorsichtig unterschichtet wurde. Die im vorangegangenen Reinigungsschritt erhaltenen Monozyten wurde vorsichtig in PBS resuspendiert und jeder Gradient mit jeweils 2 ml Monozytensuspension überschichtet und zentrifugiert (1200 rpm, 30 min, RT, ohne Bremse). Die Interphase wurde abgenommen, in 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und vor dem letzten Waschschrift wurden 200 µl als Probe für eine FACS-Färbung und zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Monozyten wurden in kaltes Einfriermedium mit einer Zellzahl von 2×10^7 /Röhrchen in Einfrierboxen eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Charakterisierung der gereinigten Zellen durch FACS

Zur Bestimmung der Reinheit der separierten Proben der Fraktionen von PBMC, T-Zellen und Monozyten wurden die Zellen mit Anti-CD3, Anti-CD19, Anti-CD14, Anti-CD16, Anti-CD56 und Anti-HLA-DR gefärbt und mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert.

4.1.6. Kultur primärer humaner T-Zellen

Eingefrorene primäre T-Zellen wurden für jedes Experiment frisch aufgetaut. Dafür wurden die T-Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut und rasch in 50 ml warmes RPMI/10% FKS überführt. Durch Zentrifugation (5 min, 1600 rpm, 24°C) wurde der DMSO-haltige Überstand entfernt, weitere zweimal mit 50 ml Kulturmedium gewaschen, die Zellen anschließend in

eine geeignete Menge Kulturmedium (RPMI/10 % FKS) aufgenommen und in einer Kulturflasche kultiviert. Die aufgetauten T-Zellen wurden nicht länger als 3 Tage verwendet.

4.2. Virologische Methoden

Die eingesetzte MOI (*multiplicity of infection*), welche die Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle angibt, wurde wie folgt berechnet und ist an entsprechender Stelle vermerkt:

$$\text{Einzusetzende Virusmenge [ml]} = \frac{\text{MOI} \times \text{Zellzahl [ml]}}{\text{TCID}_{50} \text{ [ml]}}$$

4.2.1. Zucht des MV Vakzinestammes ED

Zur Virusanzucht wurden Vero-Zellen am Vortag mit warmen ATV abgelöst und in 10 250 ml Kulturflaschen mit einer Dichte von 1×10^7 /Kulturflasche in MEM/5 % FKS ausgesät. Nachdem sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden einmal mit MEM ohne FKS gewaschen und mit ED mit einer MOI von 0.01 in MEM-Medium ohne FKS infiziert und für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C belassen. Nach beendeter Inkubation wurde das Inokulum entfernt, vollständiges Kulturmedium hinzugefügt und für 3-4 Tage in einen Brutschrank mit einer Temperatur von 33°C kultiviert bis sich ein ausgeprägter zytopathischer Effekt entwickelte. Danach wurde das Kulturmedium entfernt, 5 ml steriles PBS/Flasche hinzugefügt und über Nacht bei -20°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen rasch aufgetaut und durch Klopfen vom Kulturflaschenboden abgelöst. Die Zelltrümmer wurde in 50 ml Zellkulturröhrchen überführt und für 15 min bei 3000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Virus-haltige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, auf Eis gestellt und anschließend rasch in Einfrierröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

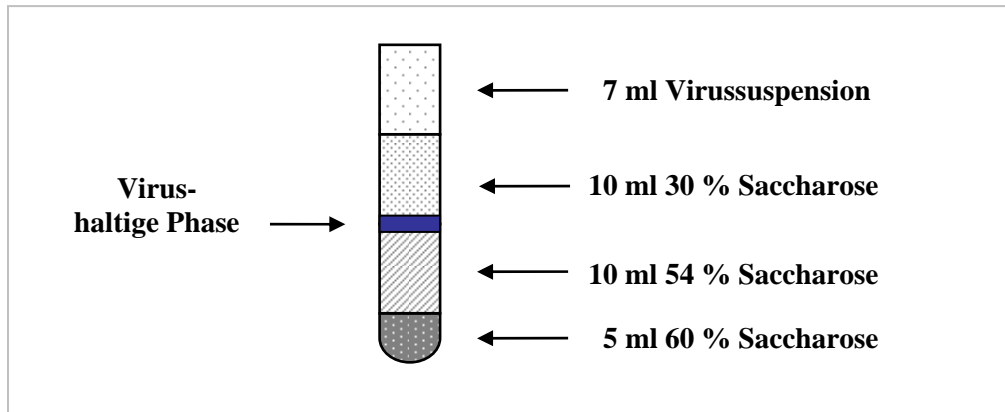
4.2.2. Zucht des MV Wildtypstammes WTF

Zur Zucht von WTF wurden BJAB-Zellen in RPMI/10 % FKS in einer mittleren 250 ml Kulturflasche ausgesät. Für die Präinfektion wurde die dicht gewachsene Kultur von 5×10^7 BJAB-Zellen in einem 50 ml Kulturröhrchen pelletiert (5 min, 1600 rpm, 24°C), mit 5 ml RPMI ohne FCS wurde resuspendiert und mit WTF einer MOI von 0.01 versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Zentrifugation wieder pelletiert, in 50 ml Medium überführt und für 2-3 Tage im Brutschrank bei 37°C bis zur Ausprägung eines zytopathischen Effektes kultiviert. Anschließend wurden je 5 ml dieser Präinfektion zu je 10 großen Zellkulturflaschen BJAB-Kultur (550 ml) hinzugefügt und für weitere 2-3 Tage die Infektion durchgeführt. Die infizierten BJAB-Zellen wurden pelletiert (5 min, 1600 rpm, 24°C) und in 3 ml PBS per Pellet resuspendiert und über Nacht bei -20°C eingefroren. Danach wurden die Zellen Eis aufgetaut und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 3000 rpm, 4°C) abgetrennt. Der gewonnene Überstand wurde auf Eis gestellt, in Einfrier- röhren rasch aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.3. Reinigung des MV WTF durch Ultrazentrifugation

Um eine höhere Reinheit und Anreicherung der Viruspräparation zu erzielen, wurde eine WTF-infizierte BJAB-Kultur (10 x 550 ml Kulturflaschen) wie im **Abschn. 4.2.2.** hergestellt und die Präparation durch Ultrazentrifugation gereinigt. Zur Virusreinigung wurden die infizierten Zellen pelletiert und in 5 ml des Überstandes je Pellet resuspendiert. Pellets und Überstand wurden separat bei -20°C eingefroren. Zur Virusreinigung wurden beide Fraktionen im 4°C-Kaltraum aufgetaut. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Je 15 ml der aufgetauten Zellpellets wurden durch 10 x *Douncen* homogenisiert und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (15 min, 3000 rpm, 4°C). Der Überstand der durch Homogenisierung aufgeschlossenen Zellen wurde mit den vorher gesammelten Zellkulturüberständen vereinigt. Je 5 ml 25 %-iger Saccharoselösung wurde in Ultra- zentrifugenröhren (Beckman, 25 x 89 mm) gegeben und mit je 32 ml Überstand vorsichtig überschichtet. Das durch Ultrazentrifugation (90 min, 25 000 rpm, 4°C) erhaltene Viruspellet wurde in je 1 ml NTE-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis belassen und bei -20°C

eingefroren. Am folgenden Tag wurden Ultrazentrifugationsröhrchen mit einem Saccharosegradienten, wie im **Schema 4.3.** illustriert, beschickt und mit 7 ml Viruslösung überschichtet und ultrazentrifugiert (120 min, 25 000 rpm, 4°C).



Schema 4.3.: Saccharosegradient zur Gewinnung gereinigter Viruspartikel.

Die Viruspartikel sammeln sich als weiße Bande in der Phase zwischen 30 % und 54 % Saccharose. Der Saccharosegradient wurde mit einer langen Kanüle durchstochen, die Virus-haltige Phase vorsichtig abgesaugt, in neue Zentrifugenröhrchen übertragen, zum Ausdünnen der Saccharose mit NTE-Puffer im Verhältnis 1:3 gemischt und durch Ultrazentrifugation pelletiert (90 min, 25 000 rpm, 4°C). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je 200 µl NTE-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis belassen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Gewinnung einer mock-Präparation wurden zusätzlich 10 große Kulturflaschen einer nicht-infizierten BJAB-Kultur wie die Virus-infizierte Kultur behandelt, über 25 % Saccharose ultrazentrifugiert, in NTE-Puffer resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Virusmenge bzw. zur Abschätzung des Gehaltes an Glykoproteinen wurde 5 µg des gereinigten Virus und 5 µg WTF mit bekanntem Titer (**Abschn. 4.2.4.**) über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Kaninchen Anti-MV H Serum detektiert **Abb. 4.1.** zeigt dies an einem Beispiel.

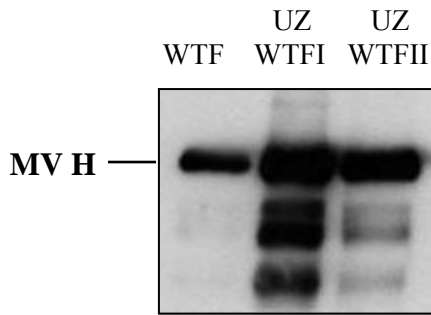


Abb. 4.1.: SDS-PAGE Gel zur Bestimmung des Gehaltes an Glykoproteinen von ultrazentri-fugierten Virus. Proben von zwei gereinigten Virusfraktionen wurde zusammen mit einem Virusstock bekannten Titeres über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt und mit einem Anti-MV H Serum detektiert.

4.2.4. Bestimmung des Virustiters TCID₅₀

Der TCID₅₀ (*tissue culture infectious dosis*) gibt die Verdünnung einer Virus-haltigen Lösung an, die ausreicht, die Hälfte einer Zellkultur zu infizieren. Zur Bestimmung des Virustiters wurden Vero-Zellen (für ED) oder B95a-Zellen (für WTF) in einer 96-well-Platte mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/well in Kulturmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde eine Virusverdünungsreihe in je 1 ml MEM ohne FCS von 10^{-1} bis 10^{-10} hergestellt. Je 100 μ l/well der jeweiligen Verdünnungen wurde in 10-fach Ansatz zu den Zellen gegeben und der Infektionsansatz für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 200 μ l/well Kulturmedium versetzt. Die Ausbildung des zytopathischen Effektes wurde im Verlauf von mehreren Tagen beobachtet und der Titer nach 5-7 Tagen gemäß der Formel von Read & Münch berechnet:

Formel zur Berechnung des Virustiters TCID₅₀:

$$\frac{(\text{positiv über } 50\%) - 50\%}{(\text{positiv über } 50\%) - (\text{positiv unter } 50\%)} = x$$

$$\log \text{TCID}_{50} = (\log \text{ Verdünnung über } 50\%) + x * \log \text{ Verdünnungsfaktor}$$

4.3. Experimentelle Methoden

4.3.1. Western Blot

SDS-PAGE

Die Lösungen für das SDS-PAGE Trenngel wurde nach **Tab. 4.1.** gemischt und sofort in eine vorbereitete SDS-PAGE Gelelektrophoresekammer gefüllt und mit 1 ml aqua dest. abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach der Polymerisierung wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm für Probestaschen eingefügt. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit 1 x Proteingelpuffer gefüllt und der Kamm entfernt.

Die Proteinproben wurden mit einer geeigneten Menge 2 x SDS-Gelladepuffer versetzt, 5 min bei 100°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des polymerisierten Geles aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes der zu untersuchenden Proteine wurde zusätzlich 10 µl eines Proteinstandards aufgetragen. Die Proteintrennung erfolgte bei 30 mA für 1.5 - 2.5 Stunden.

Tab. 4.1.: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele

| Trenngel | 10 % Acrylamidgel | 12 % Acrylamidgel |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Aqua dest | 6.5 ml | 5.6 ml |
| 1.5 M Tris pH 8.7 | 4.0 ml | 4.0 ml |
| 30 % Acrylamid | 5.3 ml | 6.4 ml |
| 20 % SDS | 80 µl | 80 µl |
| 10 % APS | 180 µl | 180 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl |

| Sammelgel | 4 % Acrylamidgel |
|------------------|-------------------------|
| Aqua dest. | 3.0 ml |
| 1 M Tris pH 6.8 | 0.63 ml |
| 30 % Acrylamid | 0.65 ml |
| 20 % SDS | 25 µl |
| 10 % APS | 50 µl |
| TEMED | 5 µl |

Western Blot

Für den Blottransfer wurde die Nitrozellulosemembran und das Wortman-Papier auf die Größe des Geles zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde für circa 10 min in 30 mM Anodenpuffer eingeweicht, das SDS-Gel in Kathodenpuffer gewaschen und eine WB-Transferkammer wie folgt beschickt:

1. 2 x Wortman-Papier durchtränkt mit Kathodenpuffer
2. SDS-PAGE Gel
3. Nitrozellulosemembran
4. 2 x Wortman-Papier durchtränkt mit 30 mM Anodenpuffer
5. 2 x Wortman-Papier durchtränkt mit 300 mM Anodenpuffer

Die Proteine wurden 1 h bei 110 mA auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Membranblockierung und Antikörperinkubation

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran mit 1 x mit PBS gewaschen, in Blockierungspuffer für 1 h bei RT inkubiert und danach 1 x mit Waschpuffer gewaschen. Die Membran wurde mit Primärantikörper in Verdünnungspuffer (**Tab. 4.2.**) über Nacht im 4°C-Kaltraum auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran wiederum 3 x für mind. 5 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und mit Sekundärantikörper in Verdünnungspuffer für 1 Stunde bei RT inkubiert. Abschließend wurde 3 x für mind. 5 min mit Waschpuffer gewaschen.

Tab. 4.2.: Verdünnungen der Antikörper im WB

| Antikörper | Blockierungslösung | Verdünnung |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| Kaninchen Anti-MV H | Milch/PBS | 1:250 in Milch/PBS |
| Maus Anti-Moesin | Milch/PBS | 1:50 in Milch/PBS |
| Kaninchen Anti-P-ERM | BSA/PBS | 1:1000 in BSA/PBS |
| Kaninchen Anti-P-Cofilin | BSA/PBS | 1:1000 in BSA/PBS |
| Kaninchen Anti-Cofilin | BSA/PBS | 1:1000 in BSA/PBS |

| | | |
|--------------------------|----|-----------------------|
| Kaninchen Anti-Maus HRP | -- | 1:10 000 in Milch/PBS |
| Ziege Anti-Kaninchen HRP | -- | 1:2000 in Milch/PBS |

Proteindetektion

Die Membran wurde mit Chemilumineszenzsubstrat (ECL) im Verhältnis 1:1 für 1 min bei RT inkubiert, überschüssige ECL-Lösung entfernt, die Membran in einer Filmkassette verschlossen und sofort im Dunkelraum auf einen Röntgenfilm für 1-5 min exponiert.

Densiometrische Auswertung

Die Signalintensität von WB-Banden wurde mit AIDA Programm, Version 4 (Raytest Isotopenmeßgeräte) ermittelt und ausgewertet.

4.3.2. Virusbindung an T-Zellen

Zur Bindung von WTF (oder ED) an T-Zellen wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 24°C) und in einer geeigneten Zelldichte in RPMI/1 % FKS resuspendiert. Um die Aufnahme viraler Partikel zu verhindern wurde zusätzlich FIP (200 µM) zugesetzt. Durch Gradienten-Ultrazentrifugation gereinigtes Virus (**Abschn. 4.2.3.**) wurde auf Eis aufgetaut und in einer MOI von 1 vorsichtig mit den Zellen gemischt. Danach wurde der Ansatz für 2 Stunden im 4°C-Kaltraum auf einem Rotator inkubiert, um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1 min, 6000 rpm, 4°C), in RPMI/1 % FKS/FIP resuspendiert und je nach Assay auf $1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$, $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ oder $1 \times 10^7/\text{ml}$ Medium eingestellt und wie unten beschrieben fortgeföhren.

4.3.3. CD3/CD28 Costimulation Virus-behandelter T-Zellen

Für Costimulation von T-Zellen wurden Kammerobjektträger (*LabTekII™ chamber slides*) verwendet. Dafür wurde der Objektträger zuerst mit 200 µl/Kammer Poly-L-Lysin (0.01 % in sterilem aqua dest.) für 10 min bei RT beschichtet, danach zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Danach wurde 200 µl/Kammer 50 µg/ml Ziege Anti-Maus IgG (in 50 mM Tris pH 9.0) für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Der Objektträger wurde zweimal mit 500 µl/Kammer PBS gewaschen, bei RT getrocknet und 15 min vor Beginn des Experimentes im Brutschrank auf 37°C vorgewärmt.

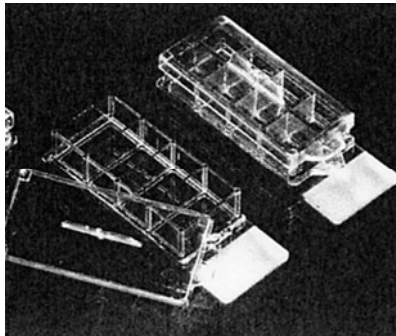


Abb. 4.2.: Kammerobjektträger von Nunc (*LabTekII™ chamber slides*). Die Objektträger werden mit Antikörper beschichtet und zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt.

In der Zwischenzeit wurden Virus- und mock-behandelte T-Zellen für 15 min auf Eis gestellt. Costimulatorische CD3 und CD28 Antikörper wurden in einer Konzentration von je 1 µg/ml hinzugefügt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl 1×10^5 T-Zellen pro Kammer auf die, wie oben erwähnt, beschichteten Objektträger gegeben und für die an entsprechender Stelle angegebenen Zeitpunkte bei 37°C in Brutschrank stimuliert.

4.3.4. Analyse von phosphorylierten Proteinen

T-Zellen wurden mit WTF und mock wie im **Abschn. 4.3.2.** beschrieben behandelt. In der Zwischenzeit wurde eine 48-well-Platte mit 100 µl/well Ziege Anti-Maus IgG für eine Stunde bei 37°C beschichtet, anschließend zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Die Platte wurde vor Beginn des Experimentes für einige Minuten im Brutschrank vorgewärmt. Pro well wurden je 100 µl 1×10^6 WTF- bzw. mock-behandelte T-Zellen hinzugefügt und für verschiedene

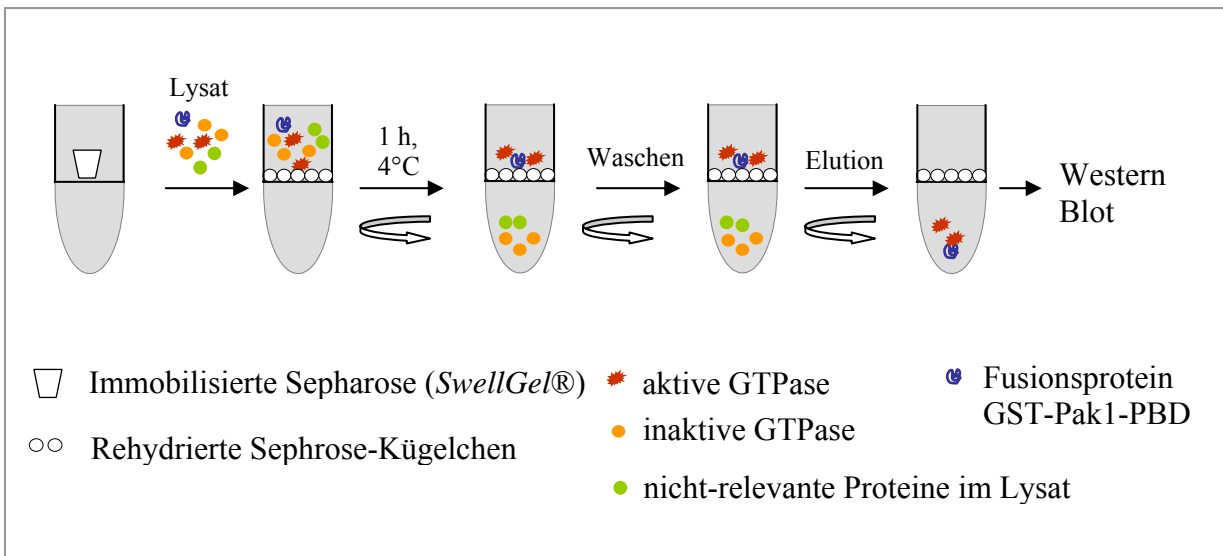
Zeitpunkte im Brutschrank mit CD3/CD28 Antikörpern stimuliert (**Abschn. 4.3.3.**). Unmittelbar nach Ende der Stimulation wurde die Platte auf Eis gestellt und die Zellen durch Zugabe von 100 µl/well kaltem 2 x SDS-Gelladepuffer lysiert. Die Lysate wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und freigesetzte DNA durch 5 x Auf- und Absaugen mit einer Einmalkanüle (Gr. 22/GA 26) gesichert. Anschließend wurden die Proben bei 100°C 5 min erhitzt, auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt. Je 40 µl pro Probe wurden über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Phospho-ERM bzw. Phospho-Cofilin Antikörpern detektiert (**Abschn. 4.3.1.**).

4.3.5. Pull down Assay zur Bestimmung der Aktivität von Rho GTPasen

Die Messung der GTP-Beladung von Cdc42 und Rac1 wurden mit einem kommerziell erhältlichen Assay der Firma Pierce Perbio durchgeführt (**Schema 4.4.**).

Pro Assayprobe wurden 1×10^7 T-Zellen eingesetzt und wie beschrieben mit mock- bzw. WTF behandelt wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 4°C), in Assaypuffer (RPMI, 0.5 % FKS/FIP) resuspendiert und mit CD3/CD28 costimulatorischen Antikörpern inkubiert (**Abschn. 4.3.3.**). Je 1 ml Probe wurden auf eine mit Ziege Anti-Maus IgG beschichtete 6-well-Platte gegeben und für die angegebenen Zeitpunkte im Brutschrank bei 37°C stimuliert. Nach Beendigung der Costimulation wurde die Kulturplatte sofort auf Eis gestellt, alle weiteren Schritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Das Stimulationsmedium wurde in vorbereitete 15 ml Röhrchen in je 3 ml eiskaltes PBS gegeben und kalt zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 4°C). In der Zwischenzeit wurde die haftenden T-Zellen durch Zugabe von 500 µl GTPase-Lysepuffer (25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 2 % Glycerol, Proteaseinhibitoren) mit Zellschabern vollständig abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand der zentrifugierten Zellen wurde abgesaugt und das Zellpellet mit dem Lysat vereinigt, gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (15 min, 13000 rpm, 4°C). Die geklärten Lysate wurden in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die enthaltene Proteinmenge mit einem BCA-Test bestimmt. Jeweils 20 µg Protein pro Lysat wurden entnommen, mit 2 x SDS-Gelladepuffer versetzt und als Ladekontrolle im WB eingesetzt. In die >kit< Filtereinsätze wurde Glutathion-Sepharose-

Kügelchen (*SwellGel*®) und 20 µg Pak1-GST bzw. 400 µg GST-RBD gegeben und mit den Lysaten für 1 Stunde im 4°C-Kaltraum unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde im 4°C-Kaltraum durch kurzes Zentrifugieren (3 Sekunden, 11 000 rpm, 4°C) im Filter sedimentiert, die Durchflußlösung verworfen und die Sepharose-Kügelchen 3 x mit 400 µl Lysepuffer wiederum durch kurzes Zentrifugieren gewaschen. Durch Zugabe 50 µl 2 x SDS-Gelladepuffer je Filtereinsatz und anschließendes kurzes Erhitzen (5 min, 100°C) wurde die gebundene GTPase von den Kügelchen gelöst und die Proben sofort 2 min bei 11 000 rpm, RT in neue Reaktionsgefäße gesammelt. Die erhaltenen 50 µl eluierter Proben und jeweils 20 µg der Zelllysate als Ladekontrolle wurden über ein 12 % SDS-Gel getrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Cdc42, Rac1 und RhoA Antikörpern detektiert.



Schema 4.4.: Schematisches Protokoll für die Bestimmung der Aktivität von Cdc42, Rac1 und RhoA im *pull down* Assay.

4.3.6. Immunfluoreszenzfärbung

Paraformaldehyd-Fixierung

Die Stimulation der T-Zellen (**Abschn. 4.3.3.**) wurde durch Zugabe von 500 µl 4% PFA in PBS gestoppt. Nach 20 min bei RT wurde das Paraformaldehyd vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl 0.1 % Triton-X100 auf Eis permeabilisiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit 500 µl PBS gewaschen, um das Triton-X100 zu entfernen. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde 500 µl 5 % BSA dazugegeben und 20 min bei RT belassen. Die jeweiligen Primärantikörper wurden in 1 % BSA verdünnt, 100 µl/Kammer zugefügt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Färbungen 4 x mit 200 µl 1 % BSA gewaschen, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Sekundärantikörper wurden in 1 % BSA verdünnt, 100 µl/Kammer 45 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Falle einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde Phalloidin-Alexa594 dem Sekundärantikörper zugefügt. Die Färbungen wurden mit 4 x 200 µl PBS gewaschen. Um mögliche PBS-Kristalle zu entfernen, wurden die Färbungen für 5 min mit 500 µl aqua dest. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Kammerstruktur entfernt, die Objektträger kurz getrocknet und mit einigen Tropfen Eindeckmedium mit einem Deckglas abgedeckt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Objektträger im Kühlschrank aufbewahrt.

PHEMO-Fixierung

Zur Visualisierung von Mikrotubulinstrukturen wurde die DC/T-Zell-Konjugatbildung (**4.3.9.**) durch Zugabe von je 500 µl 37°C-warmen 1-fach PHEMO-Fix-Lösung (146) im Brutschrank für exakt 10 min fixiert. Anschließend wurde die fixierten Zellen je zweimal mit 500 µl 37°C-warmen 1-fach PHEMO-Puffer für exakt 5 min im Brutschrank inkubiert und anschließend je zweimal mit 500 µl PBS für 5 min bei RT gewaschen, weitere 10 min mit 500 µl 50 mM NH₄Cl und abschließend dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurde mit der Blockierung (5% BSA) und der Immunfluoreszenzfärbung (Maus Anti- α Tubulin Antikörper) wie oben beschrieben fortgefahren. Eine Permeabilisierung ist nicht notwendig, da PHEMO-Fix bereits permeabilisierend wirkt.

4.3.7. T-Zell-Polarisierung

Zur Messung der Polarisierung von humanen T-Zellen wurde 8-Kammer Objektträger (*LabTekII™ chamber slides*) mit 200 µl/Kammer 20 µg/ml humanes Plasmafibronektin in PBS über Nacht bei 4°C immobilisiert. Danach zweimal mit 500 µl/Kammer PBS gewaschen, die unspezifischen Bindungsstellen mit 2.5% BSA für 1-2 Stunden im Brutschrank geblockt, und anschließend 3 x mit 500 µl/Kammer PBS gewaschen. Der Objektträger wurde 1 Stunde bei RT getrocknet und 5 min vor Beginn des Experimentes im Brutschrank vorgewärmt. Pro Kammer wurden 100 µl 2×10^5 mock- bzw. WTF-behandelte Zellen in PBS für 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das PBS vorsichtig entfernt, die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit 0.01% Triton-X100 permeabilisiert und mit Alexa 594-konjugiertem Phalloidin für 20 min bei RT gefärbt. Abschließend wurden die Färbungen 4 x mit 200 µl PBS gewaschen und T-Zell-Polarisierung mikroskopisch analysiert.

4.3.8. T-Zell-Adhärenzassay

Zur Messung von T-Zell-Adhärenz wurde 100 µl/well 5 µg/ml rekombinantes humanes ICAM-1/Fc (in PBS) für 2 Stunden bei RT in einer 96-well-Flachbodenplatte immobilisiert. Danach wurde zweimal mit 200 µl/well PBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 100 µl/well 2.5% BSA für 1-2 Stunden im Brutschrank geblockt, anschließend 3 x mit 200 µl PBS gewaschen und 5 min vor Beginn des Experimentes im Brutschrank vorgewärmt. Für Integrin-unabhängige Kontrollexperimente wurde einige wells mit 0.01 % Poly-L-Lysin beschichtet. T-Zellen wurden 1 x mit Kulturmedium (ohne FKS) gewaschen und je 1×10^6 in 5 ml Medium (ohne FKS) mit 5 µl Calcein-20 (1 µM in DMSO) für 15 min im Brutschrank inkubiert, danach 3 x mit Medium (ohne FKS) durch Zentrifugation (5 min, 1600 rpm, 24°C) gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden in Assaypuffer (20 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.5% BSA/FIP) aufgenommen, anschließend die Zellen mit mock- bzw. WTF inkubiert, kurz zentrifugiert (1 min, 6000 rpm, 4°C) in Assaypuffer resuspendiert, 100 µl 1×10^5 Zellen/well in die wells gegeben und LFA-1 durch Zugabe von 100 µl/well 200 µM MnSO_4 bei 37°C aktiviert. Nach 1 Stunde wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Fluoroscan Ascent bei 520 nm gemessen. Anschließend wurde vorsichtig 100 µl/well

Medium entnommen, 3 x mit 100 µl/well warmen Assaypuffer gewaschen und die verbliebenen adhärenen Zellen mit dem Fluoroscant Acent gemessen.

4.3.9. Generierung von dendritischen Zellen (MoDC) aus primären Monozyten – Analyse der DC/T-Zell-Konjugatbildung

Zur Generierung von dendritischen Zellen wurden Monozyten wie im **Abschn. 4.1.6.** erwähnt, aufgetaut und in einer 6-well-Platte in einer Zelldichte von 1.5×10^6 /well in 3 ml RPMI/10 % FKS ausgesät. Dem Medium wurde 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 hinzugefügt. Jeden zweiten Tag wurde das Medium erneuert und mit frischen Wachstumsfaktoren versetzt. Am Tag 6 wurden die so erhaltenen unreifen DC durch Zugabe von 100 ng/ml LPS ausgereift. Die ausgereiften DC wurden am Tag 7-8 für Experimente eingesetzt. Zur Analyse der DC/T-Zell-Konjugatbildung wurden T-Zellen in Medium mit WTF mit einer MOI von 1 (RPMI/0.5 % FKS/FIP) für 2h, 4°C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (1 min, 6000, rpm, 4°C), in Medium (RPMI/0.5 % FKS/FIP) resuspendiert und auf eine Zellkonzentration von 2×10^5 /100 µl eingestellt. In der Zwischenzeit wurden 8-Kammerobjektträger (*LabTekII*TM) mit 200 µl/Kammer Poly-L-Lysin (0.01 % in sterilem aqua dest.) für 10 min bei RT beschichtet, anschließend 3 x mit je 500 µl PBS gewaschen. Die Objektträger wurde vor der Verwendung für einige Minuten im Brutschrank erwärmt. Die LPS-gereiften MoDC wurden 5 min, 1200 rpm, 24°C zentrifugiert, in Medium (RPMI/0.5 % FKS/FIP) resuspendiert und auf eine Zellmenge von 0.5×10^5 /100 µl eingestellt. Zur Beladung des MHCII-Rezeptors wurden 1 µg/ml SEA und 1 µg/ml SEB hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl MoDC pro Kammer hinzugefügt und für weitere 15 min im Brutschrank adhäreniert. Zur T-Zell-Suspension wurde ebenfalls 1 µg/ml SEA und 1 µg/ml SEB zugegeben und 100 µl T-Zellen/Kammer zu den MoDC gegeben, womit sich ein DC/T-Zell-Verhältnis von 1:4 ergab. Die Konjugatbildung wurde für 20-25 min im Brutschrank durchgeführt. Danach wurden vorsichtig 100 µl des Mediums entfernt, unmittelbar 500 µl 4% PFA zugefügt und die Zellen für 10 min bei RT fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde wie im **Abschn. 4.3.6.** fortgeführt.

4.3.10. Transfektion von primären T-Zellen

Zur Transfektion von primären T-Zellen wurde der Amaxa *Nucleofector*TM kit nach dem empfohlenem Protokoll verwendet. Dafür wurden T-Zellen am Vortag aufgetaut. Zur Vorbereitung wurden die zu transfizierende Plasmid-DNA Aktin-eGFP (p4010, Clontech), die T-Zell-spezifische *Nucleofector*TM-Lösung für 30 min bei RT und 3 ml Kulturmedium (RPMI/10% FKS) im Brutschrank erwärmt. Pro Transfektion wurden 1×10^7 T-Zellen in einem 15 ml Röhrchen pelletiert (5 min, 1600 rpm, 24°C), das Medium vollständig abgesaugt und das Zellpellet mit 100 µl *Nucleofector*TM -Lösung resuspendiert. Anschließend wurde 10 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in die zertifizierte Amaxa-Küvette überführt und das T-Zell-spezifische Programm U-14 gewählt. Die transfizierten T-Zellen wurden in 37°C warmen Kulturmedium (RPMI/10% FKS) aufgenommen und 24 h nach der Transfektion für die mikroskopische Analyse eingesetzt.

4.3.11. Live cell imaging

Persistierend ED-infizierte U251p-Zellen wurden am Vortag mit einer Zelldichte von 1×10^5 /Kammer in 500 µl Kulturmedium (RPMI/5% FKS) in 8-Kammerdeckgläser (*LabTek*TM *chamber slice*) ausgesät. Zur Kontrolle wurden nicht-infizierte U251-Zellen ausgesät. Vor der Analyse wurden die Zellen einmal mit 500 µl Kulturmedium gewaschen und 200 µl RPMI/5 % FKS/FIP/Hepes pro Kammer zugegeben. Um eine bessere Pufferwirkung zu erzielen wurde das Medium mit 25 mM Hepes pH 7.4 supplementiert. Aktin-eGFP-transfizierte T-Zellen wurden pelletiert (5 min, 1600 rpm, 24°C), in RPMI/5 % FKS/FIP/Hepes resuspendiert und bis zur Analyse im Brutschrank gehalten. Für jede Analyse wurden 100 µl 4×10^5 T-Zellen frisch zu U251-Zellen hinzugefügt und die Kammer sofort mittels konfokalem Mikroskop analysiert. Zusätzlich wurde ein Objektischheizer und Objektivheizung (von Zeiss) eingesetzt, mit dem die Zellen bei 37°C gehalten werden konnten.

4.3.12. Konfokale Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie wurde mit Zeiss LSM510 Meta durchgeführt (Software Version 3.2 SP2), ausgestattet mit einem Axiovert 200 Mikroskop und einem 63 x Öl-Immersionsobjektiv (Numerische Aperatur 1.4 Plan Apochromat). Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit den 488- oder 564-nm-Laserkennlinien (Argon/Helium-Neon-Laser). Vertikale z-Stapel wurden mit 20 optischen Schnitten durch die gesamte Zelle im Abstand von 0.5 μm aufgenommen. Anhand dieser Bilddaten wurden 3-dimensionale Bilder mit einer integrierten Software von Zeiss rekonstruiert. Die 3-dimensionale Darstellung entsteht aus der Summe der zweidimensionalen Bilder (xy-Dimension), die in verschiedenen Fokusebenen aufgenommen werden, wodurch sich die gesamte räumliche Information der Probe ergibt (3D - xyz-Dimension). Da in der Fluoreszenzmikroskopie Licht oberhalb- und unterhalb der Fokusebene vor allem bei der Aufnahme von z-Stapel zu einem verwaschenen Bild führen können, wurde bei einigen Analysen eine 3D-Dekonvolutionssoftware (Zeiss) angewendet. Mit Hilfe dieser Softwarelösung kann das störende Streulicht mathematisch zum Ursprungsort zurückgerechnet werden. Durch Dekonvolution-Methoden wird der Verzerrungsgrad (PSF - *Point-Spread-Function*) berechnet. Somit wird die verzerrte Struktur „entfaltet“ (=Dekonvolution). Das Ergebnis ist eine entwaschene Darstellung, höhere Auflösung und bessere Bildqualität.

4.3.13. Rasterelektronenmikroskopie

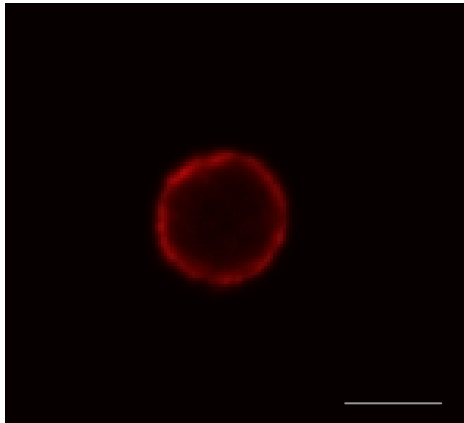
Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in der Abt. Elektronenmikroskopie am Biozentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden je 5×10^5 T-Zellen wie bereits beschrieben mit mock- bzw. WTF-behandelt und auf 12 mm Deckgläschen in einer 24-well-Platte mit CD3/CD28 Antikörpern für 10 min bei 37°C costimuliert. Um die Reaktion abzustoppen und zu fixieren, wurden zu je 100 μl T-Zellen 600 μl kaltem 6.25 % Glutaraldehyd in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.2 hinzugefügt, für 10 min bei RT und anschließend bei 4°C über Nacht belassen. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen in der Abteilung Elektronenmikroskopie mit Aceton entwässert, anschließend ‚Kritisch-Punkt‘-getrocknet und mit einem Rasterelektronenmikroskop Leica DSM 962 analysiert.

5. Ergebnisse

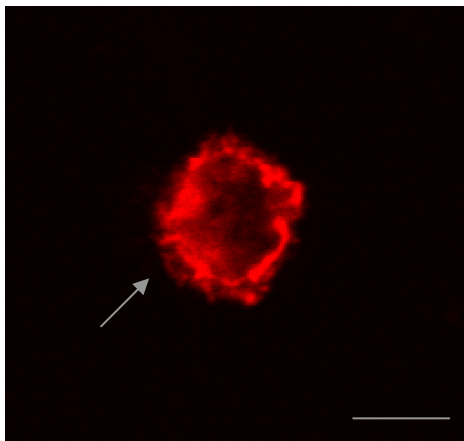
5.1. T-Zell-Stimulation durch CD3/CD28 Ligation

Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, die für eine vollständige T-Zell-Aktivierung und für eine funktionelle Immunantwort erforderlich sind. Eine volle Aktivierung von T-Zellen erfordert neben TCR-vermittelten Signalen zusätzliche costimulatorische Signale, z.B. durch CD2 und CD28 Rezeptoren. Für die Costimulation *in vitro* gibt es mehrere Möglichkeiten, (i) Aktivierung von T-Zellen durch CD3 und CD28 Antikörper, die in Lösung zur T-Zell-Suspension hinzugefügt werden, (ii) durch CD3 Antikörper in Kombination mit anderen Antikörpern, die an Rezeptoren binden, die ebenfalls costimulatorisch wirken können (z.B. CD2, CD28, CD86, Flotilline, 147) und (iii) durch CD3/CD28-Antikörper, die mit einem Anti-Maus IgG Antikörper ligiert werden. Die letztgenannte Methode läßt sich "in Lösung" durchführen oder durch die so genannte Platten-gebundene Methode, bei welcher Zellkulturplatten mit Antikörper beschichtet sind. Im Gegensatz zum löslichen System können Platten-gebundene Antikörper T-Zellen nicht simultan alle auf der Oberfläche exponierte TCR ligieren. Stattdessen ermöglichen Platten-gebundene Antikörper einen polarisierten Stimulus und führen zu morphologischen Änderungen der Zellen, die Rezeptoren in den Kontaktbereich der aktivierten Oberfläche translozieren. Der Kontakt aktivierter T-Zellen mit Platten-gebundenen Antikörpern führt zu drastischen morphologischen Änderungen und Reorganisationen des Zytoskeletts. Damit ist diese Methode ausgezeichnet geeignet, um TCR-abhängige Signalwege zu untersuchen, die zur Aktivierung von Zytoskelett-Komponenten und morphologischen Veränderungen führen. In vorliegender Arbeit wurden ein aus der Literatur adaptiertes Protokoll etabliert, bei dem T-Zellen mit CD3/CD28 Antikörpern inkubiert und anschließend für unterschiedliche Zeitpunkte auf mit Anti-Maus IgG-beschichtete Kulturplatten oder Objektträger gegeben werden (148,149). Infolgedessen kann das Zellvolumen um das Mehrfache vergrößert werden. **Abb. 5.1.** zeigt dies an einem Beispiel. T-Zellen wurden auf Objektträgern für die angegebenen Zeitpunkte mit CD3/CD28 costimuliert, fixiert, permeabilisiert und F-Aktin mit Phalloidin-Alexa594 gefärbt.

(A) unstimuliert



(B) 5 min CD3/CD28



(C) 10 min CD3/CD28

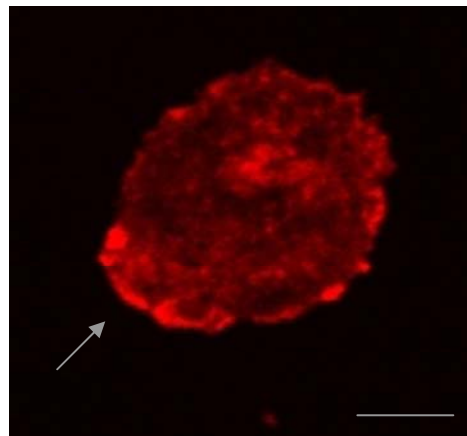


Abb. 5.1.: F-Aktin Färbung von T-Zellen. Konfokale Aufnahmen von unstimulierten (ruhenden) T-Zellen (A) und CD3/CD28 costimulierte T-Zellen (B,C). Die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert, mit 0.01 % Triton-X100 permeabilisiert und mit Phalloidin-Alexa594 gefärbt (Maßstab 5 μ m). Die Pfeile weisen auf Filopodien- (B) und Lamellipodien-Strukturen (C) hin.

Im ruhenden Zustand weisen T-Zellen eine runde Form auf. F-Aktin, als Hauptbestandteil des intrazellulären Zytoskelettes, ist in einer ringförmigen Struktur unterhalb der Zell-membran lokalisiert (Abb. 5.1.A). Unmittelbar nach dem initialen Kontakt mit Platten-gebundenen Antikörpern (Abb. 5.1. B und C) kommt es zur Aktivierung des Zytoskeletts, die Zellen verbreiten sich auf dem Objektträger und es kommt zur Ausbildung peripherer Aktin-reicher Zonen. Die Pfeile in Abb. 5.1.B und C geben die Spitze von Filopodien- und Lamellipodien-Strukturen an, die von den reagierenden Zellen radial ausgedehnt werden. Der Antikörperkontakt initiiert die Ausbildung kleiner filopodialer Strukturen (Pfeil in Abb. 5.1. B), die im Zeitverlauf zu Lamellipodien-Strukturen auswachsen. Wahrscheinlich treiben

Lamellipodien und Aktin-reiche Zonen (Pfeil in C) die Ausbildung fester Kontakte zwischen T-Zellen und Objektträger an. Nachdem die Antikörper-induzierte Aktivierung ein Maximum zwischen 10–15 min nach dem initialen Kontakt erreicht, bilden sich im Aktin-Ring nach etwa 15–20 min Lücken und die gebildeten Strukturen brechen zusammen.

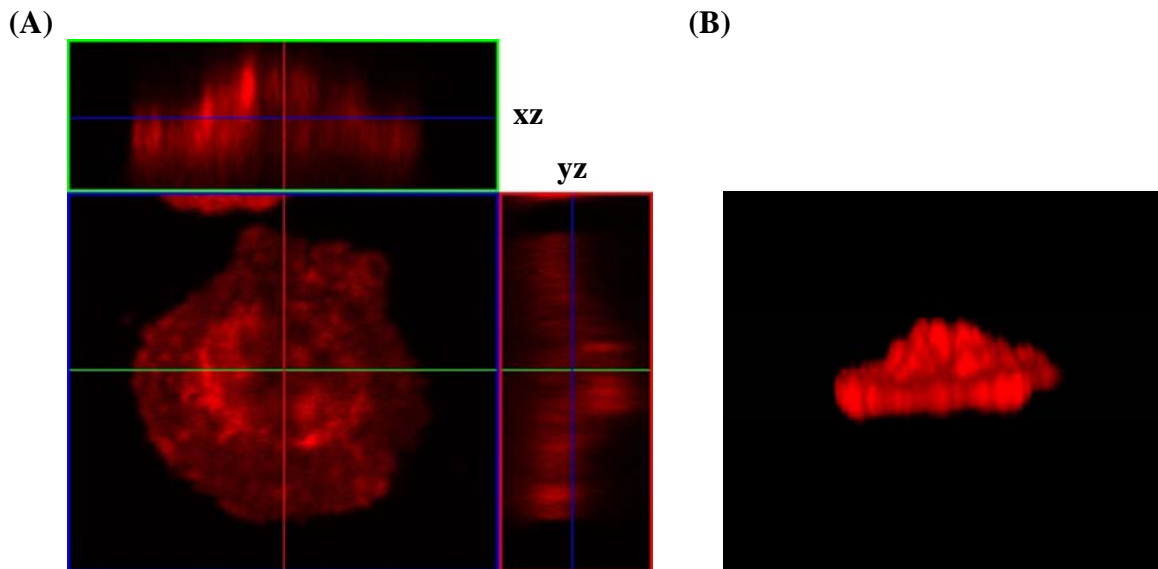
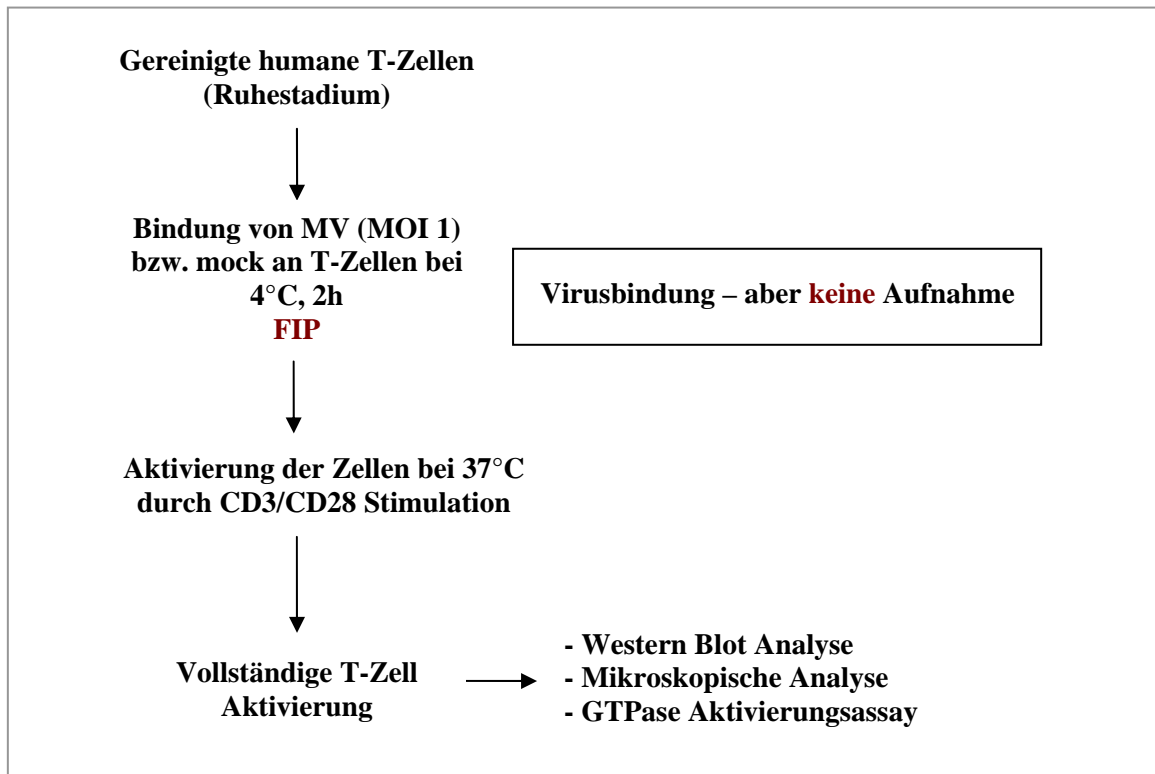


Abb. 5.2.: Projektion eines z-Stapels auf einer horizontalen Fläche einer F-Aktin gefärbten T-Zelle. Die Seitenansicht (A) und die 3D-Rekonstruktion (B) zeigen die polarisierte Struktur der für 10 min CD3/CD28 costimulierten Zelle.

Da aufgrund TCR-induzierter Aktivierung innerhalb weniger Minuten F-Aktin getriebene Strukturen gebildet werden, wurde dieses experimentelle System für die vorliegende Arbeit verwendet, um den Einfluss der Bindung von MV an T-Zellen auf Polymerisierung des Zytoskelettes und ebenso auf die Lokalisation anderer Proteine zu untersuchen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit die Zellen auf geeigneten Kulturplatten zu stimulieren, anschließend direkt zu lysieren und die Zelllysate für Western Blot Analysen zu verwenden. Das **Schema 5.1.** zeigt den allgemeinen Versuchsaufbau.



Schema 5.1.: Schematisches Protokoll des allgemeinen Versuchsaufbaus. Gereinigte humane T-Lymphozyten werden mit MV bzw. mock in Gegenwart von FIP inkubiert. Der Fusionsinhibitor erlaubt die Bindung von MV, verhindert aber die Aufnahme viraler Partikel. Anschließend werden die Zellen durch CD3/CD28 Ligation aktiviert und das Aktivierungsprofil anhand verschiedener Methoden analysiert.

Für die Experimente wurden aus Leukaphereseblut gereinigte primäre humane T-Zellen eingesetzt, die mit MV bzw. mock (Zellkulturüberstand nicht-infizierter Zellen) in Gegenwart von Fusionsinhibitor (FIP) für 2 h bei 4°C inkubiert (**Schema 5.1.**) wurden. Dadurch wird gewährleistet, dass es zwar zu einer effizienten MV-Bindung an die Zelloberfläche kommt, die Aufnahme viraler Partikel aber verhindert wird. Das MV Virus bindet an die Zellmembran bzw. an die Rezeptoren, kann die Zellen aber nicht mehr infizieren. Danach erfolgte die Costimulation mit CD3/CD28 Antikörpern bei 37°C für verschiedene Zeitpunkte. Anschließend wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt und mikroskopisch analysiert, oder unmittelbar nach der Stimulation lysiert und die Aktivierung verschiedener Signalproteine durch Western Blot Analyse detektiert. Obwohl eine effiziente T-Zell-Aktivierung eine Stimulation des TCR erfordert, werden auch andere costimulatorische

Signale benötigt. Interessanterweise wurde gezeigt, dass CD46, der Rezeptor für MV ED, ein potentes costimulatorisches Molekül für humane T-Zellen ist und zu einer starken T-Zell-Proliferation führt (150). Um eine Interferenz der Signale zu vermeiden wurde in vorliegender Arbeit im wesentlichen nur WTF eingesetzt. Auch CD150, der Rezeptor für alle MV Stämme, kann T-Zellen costimulatorisch aktivieren, allerdings ist das Molekül auf ruhenden humanen T-Zellen nicht exprimiert und spielt daher für diese Arbeit keine Rolle (96).

5.2. WTF-Bindung an T-Zellen verhindert Transport von Vav an die Plasmamembran

Vav, der GEF (*guanine exchange factor*) für die Familie der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1, katalysiert den Austausch der inaktiven GTPase von der GDP-gebundene in die aktive GTP-gebundenen Konformation. Der Transport und die Involvierung in den TCR-Komplex ist Voraussetzung für die Aktivität des Proteins (97). Dadurch kann Vav mit weiteren Signalmolekülen interagieren. Anhand von Membran-raft-Gradientenzentrifugation wurde gezeigt, dass MV Proteine vor allem in den Membran-raft-enthaltenen Fraktionen zu finden sind (96). Des weiteren enthielten diese Fraktionen nach CD3/CD28 Ligation deutlich weniger Vav Protein als die mock-behandelten Zellen. Daher wurden T-Zellen mit mock-bzw. WTF inkubiert, durch CD3/CD28 für 10 min costimuliert und nach Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch analysiert (**Abb. 5.3.**).

In mock-behandelten Zellen zeigt Vav eine starke Membranlokalisation nach CD3/CD28 Ligation, währenddessen diese in WTF-behandelten Zellen drastisch reduziert ist. Durch den Kontakt mit Platten-gebundenen Antikörper konzentriert sich Vav in den Kontrollkulturen in so genannten Aktivierungsclustern, dagegen sind die Cluster in WTF-behandelten Zellen nur ungleichmäßig ausgeprägt. Die Membranbindung von WTF bewirkt ein lokales Zusammenschieben des Vav-Proteins (Pfeil in **5.3.**) an der Kontaktstelle und Colokalisation von MV und Vav, angezeigt durch ein gelbes Überlappungssignal.

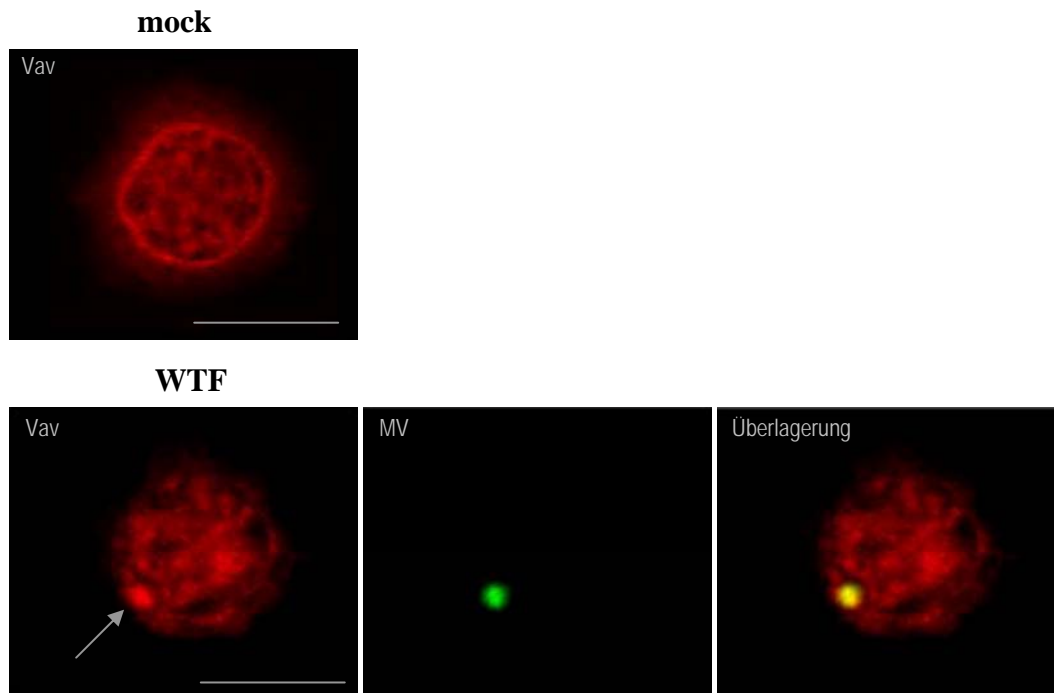


Abb. 5.3.: WTF-Bindung an T-Zellen verhindert den Transport von Vav zur Plasmamembran. Die Zellen wurden mit WTF (MOI 1) inkubiert, durch CD3/CD28 Ligation für 10 min costimuliert, mit 4 % PFA fixiert, mit Vav und MV-Serum gefärbt und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert. Zur erkennen ist die Membranlokalisation von Vav in mock-behandelte Zellen und eine deutliche Reduktion in WTF-behandelten Zellen. Außerdem scheint die Ausbildung der Aktivierungscluster gestört zu sein. Die Membranbindung von WTF bewirkt ein lokales Zusammenschieben des Vav-Proteins in der Kontaktzone (Pfeil). Die Aufnahmen zeigen die xy-Ebene durch den mittleren Bereich der Zellen, etwa 3 μm oberhalb des Objektträgers. Über 100 Zellen je Färbung wurden analysiert. (Maßstab 5 μm)

5.3. Aktivierungscluster und Lokalisation der GTPasen Cdc42 und Rac1 ist in CD3/CD28 stimulierten T-Zellen nach WTF-Bindung verändert

Der veränderte Transport und die Verteilung des Vav Proteins sollte einen Einfluß auf die Aktivierung von Rho GTPasen haben, welche verschiedene Rezeptor-stimulierte Zytoskelettveränderung kontrollieren und so Morphologie, Adhäsion und Bewegung von Zellen regulieren (103). T-Zellen wurden mit mock- bzw. WTF für 2 h bei 4°C inkubiert, anschließend mit Platten-gebundenen Antikörpern durch CD3/CD28 Ligation stimuliert. Die Aktivierung wurde durch Fixierung gestoppt und eine Immunfluoreszenzfärbung mit Cdc42 und Rac1 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Um eine bessere Bildauflösung der durch

die CD3/CD28 Ligation induzierten Aktivierungscluster zu erhalten, wurden konfokale z-Stapel der xy-Ebenen analysiert und eine Dekonvolution der Aufnahmen durchgeführt. Die Aufnahmen in **Abb. 5.4.A** zeigen die Ebene, in der die Zellen in engem Kontakt mit den Platten-gebundenen sind, d.h. eine Objektträger-nahe Ansicht. In der Kontrollzelle gut zu erkennen sind die konzentrierten Cdc42 Aktivierungscluster, die sich auch in die Membranausdehnungen hineinziehen (Pfeil in **5.4.A**). Dagegen zeigen die WTF-behandelten Zellen morphologische Veränderungen, deutlich verkürzte Lamellipodien und nur geringfügig ausgebildete Cluster. Die selben Veränderungen finden sich auch in für Rac1-gefärbten Zellen (**Abb. 5.4.B**). Diese konfokalen Aufnahmen zeigen die mittlere Zellebene. Gut zu erkennen ist die drastisch verringerte ringförmige Membranlokalisation von Rac1. Des weiteren ist Rac1 nur sehr schwach in Aktivierungsclustern konzentriert. Die quantitative Analyse der WTF-behandelten T-Zellen ergab, bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen, für Cdc42 ~30 % und für Rac1 ~20 % verringerte Membranlokalisation im Verhältnis zu Kontrollzellen. Dagegen konnte in der Verteilung von RhoA kein Unterschied zwischen mock und WTF-behandelten Zellen gefunden werden (**Abb. 5.4.C**). Wie in **Abb. 5.8**. gezeigt, sind WTF-behandelte T-Zellen ~50 % weniger adhärent und gehen damit bei der Immunfluoreszenzanalyse verloren. Vermutlich ist die Anzahl der T-Zellen, die nach WTF-Bindung verändert sind, deutlich höher.

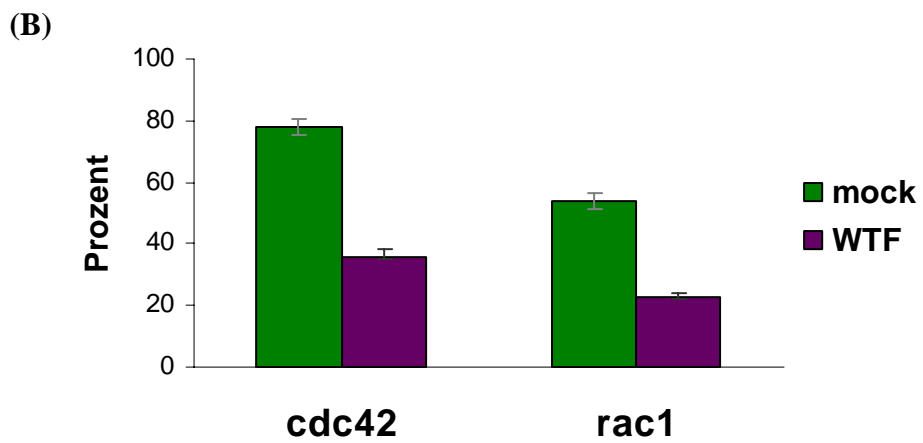
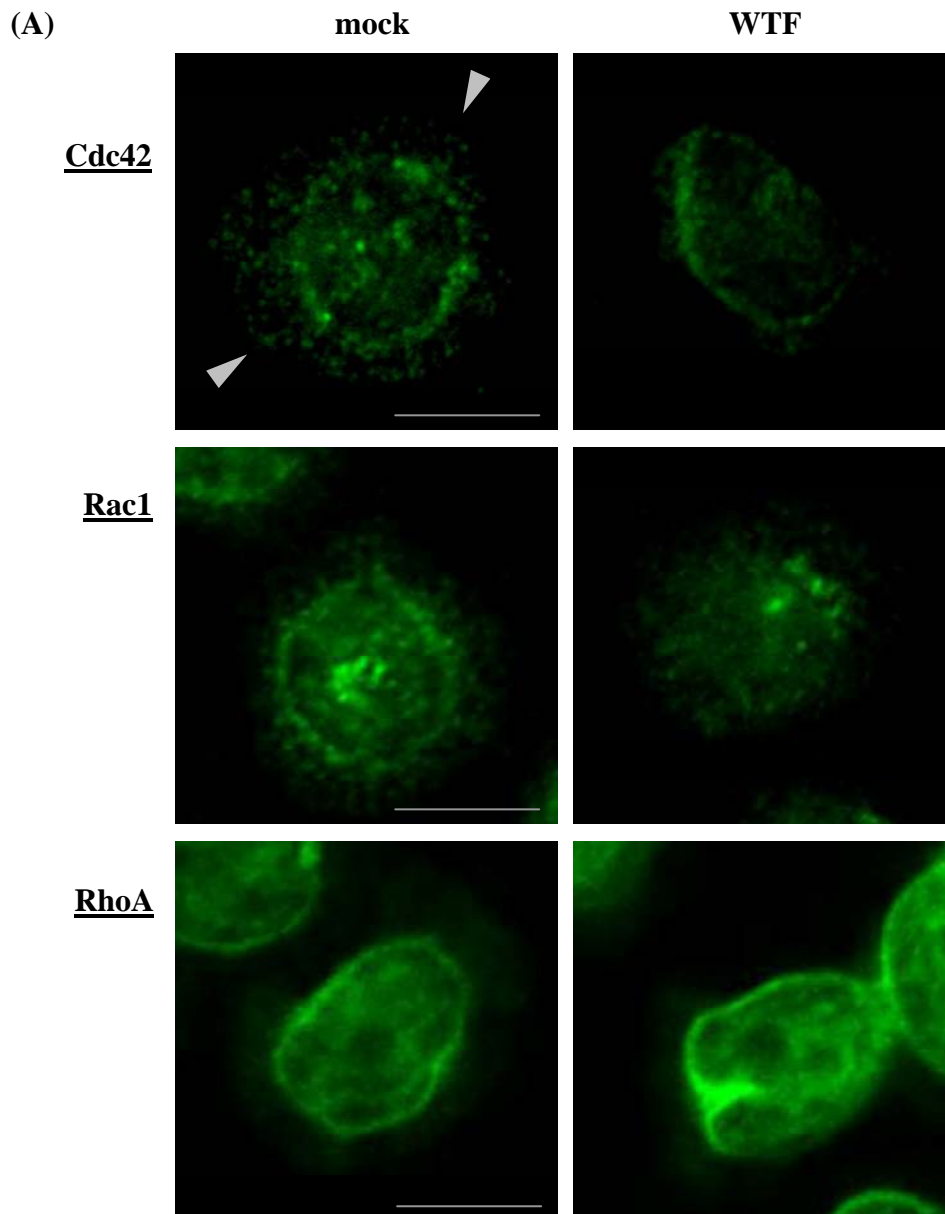
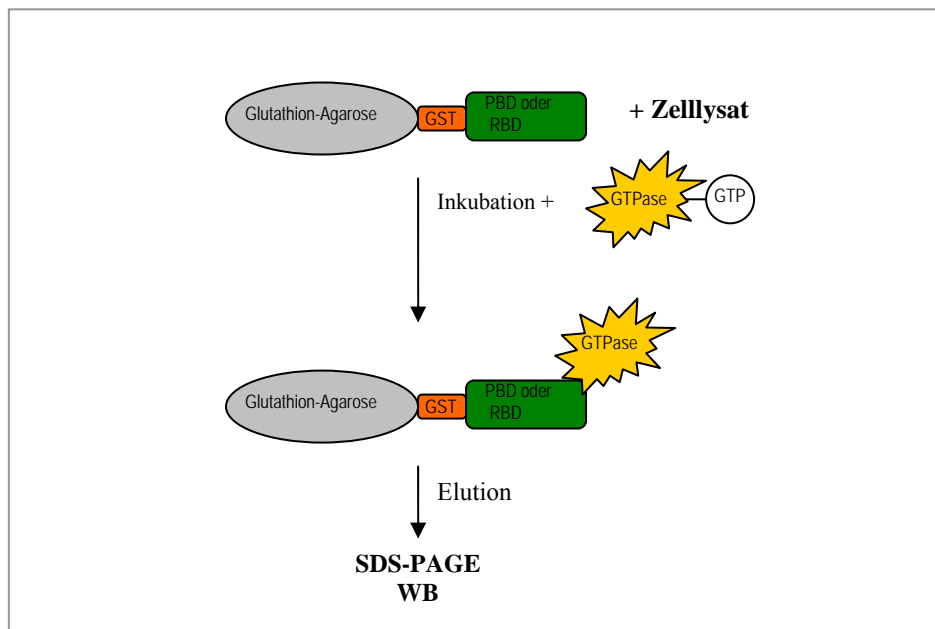


Abb. 5.4.: Cdc42 und Rac1 Verteilung in mock- bzw. WTF-behandelten CD3/CD28 stimulierten T-Zellen. T-Zellen wurden mit mock oder WTF inkubiert, für 10 min costimuliert, mit 4 % PFA fixiert und mit Cdc42, Rac1 und RhoA gefärbt. (A) Ein Z-Stapel von 20 optischen xy-Schnitten wurden aufgenommen und mit der LSM510 Software dekonvuliert. Abgebildet ist die untere Ebene kurz über dem Objektträger, bei der die Zellen im direkten Kontakt zu den Platten-gebundenen Antikörper sind. Die Bereiche mit höherer Signalintensität entstehen durch Überlagerung von Clustern. Die Zellen wurden in der mittleren Schnittebene dargestellt. (Maßstab 5 µm) (B) Quantitative Analyse von Cdc42 und Rac1 gefärbten Zellen. Dafür wurden zehn gleich große Mikroskopfelder ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, inwieweit die WTF-Bindung an die Membran auch die GTP-Beladung und damit die Aktivität der GTPasen beeinflusst, wurden T-Zellen durch CD3/CD28 Ligation für verschiedene Zeitpunkte costimuliert, lysiert und GTPase-Aktivität anhand eines *pull down* Assays nachgewiesen (Abb. 5.5.). Der Assay basiert auf dem Prinzip, dass die aktive GTPase über die Bindung an ein spezifisches Effektorprotein aus dem Lysat ‚herausgezogen‘ und durch Western Blotting mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen wird (Schema 5.2.).



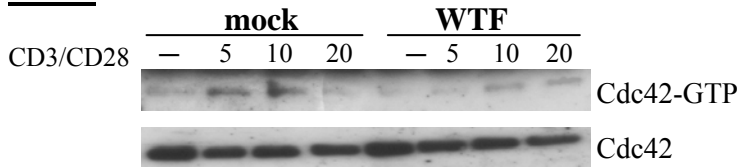
Schema 5.2.: Schematische Illustration des GTPase pull down Assays. Die GTPase Bindungsdomäne des jeweiligen Effektormoleküls als rekombinantes GST-Fusionsprotein (PBD oder RBD), das an Glutathion-Sephadex immobilisiert ist. GST-Pak1 PBD oder GST-Rhotekin RBD wird mit dem Lysat von stimulierten T-Zellen inkubiert, die aktive GTPase eluiert und durch WB mit einem spezifischen Antikörper analysiert.

GTPasen wechseln zwischen dem inaktiven GDP- und dem aktiven GTP-gebundenen Status, welcher durch Vav katalysiert wird. Als GTPase-Bindungsdomäne dient die N-terminale regulatorische Region der *p21-activated-kinase 1*, welche die p21-Bindungsdomäne (PBD) für Cdc42 und Rac1 enthält, und die N-terminale Region von Rhotektin, welches die RhoA-Bindungsdomäne (RBD) enthält. Die GTPase-Bindungsdomäne ist rekombinant exprimiertes Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein, das an Glutathion-Sepharose immobilisiert ist und zur Affinitätspräzipitation (*pull down*) der aktiven GTPase verwendet wird.

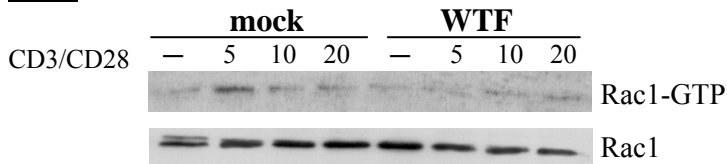
Nach 5 min CD3/CD28 Ligation in mock-behandelten Zellen weisen die GTPasen Cdc42 und Rac1 eine hohe GTP-Beladung auf (**Abb. 5.5.A**) und sinkt in den späteren Zeitpunkten der Stimulation stark ab. Dagegen zeigen WTF-behandelte Zellen zu keinem Zeitpunkt der Stimulation eine GTP-Beladung. Da die GTPase RhoA nicht durch Vav aktiviert wird, ist es nicht überraschend, dass die GTP-Beladung von RhoA in WTF-behandelten Zellen nicht reduziert ist. Allerdings ist RhoA in nicht-stimulierten Zellen leicht erhöht und verstärkt aktiviert nach CD3/CD28 Costimulation (**Abb. 5.5. A und B**).

(A)

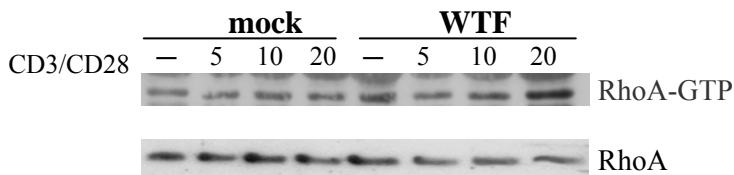
Cdc42



Rac1



RhoA



(B)

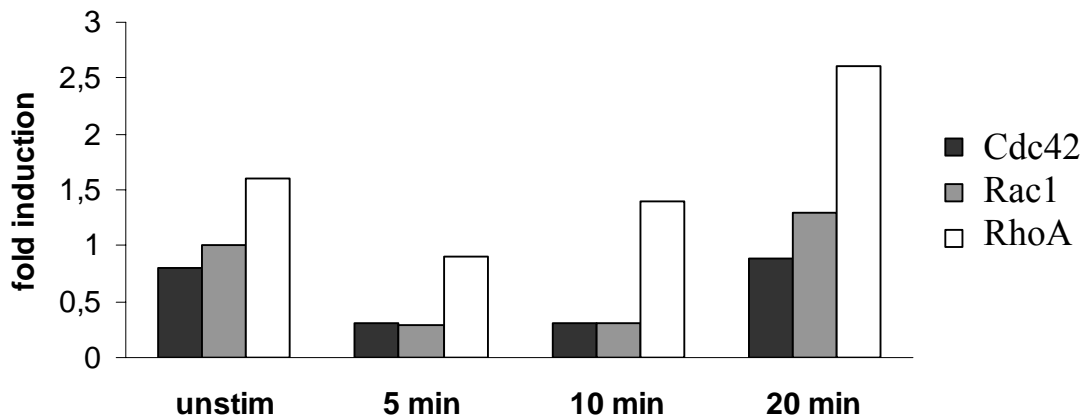


Abb. 5.5.: Analyse der GTP-Beladung von Cdc42, Rac1 und RhoA in CD3/CD28 stimulierten Zellen nach WTF-Bindung. (A) Mock- bzw. WTF-behandelte T-Zellen wurden durch CD3/CD28 Ligation costimuliert, mit GTPase Lysepuffer lysiert, die gewonnenen Lysate (Proteingehalt 300 µg) mit 20 µg GST-Pak1 PDB bzw. 400 µg GST-RBD inkubiert, aktive GTPasen eluiert und durch Western Blotting mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Zusätzlich wurden 20 µg der Zelllysate als Ladekontrolle aufgetragen. (B) Quantitative Auswertung der WB Analyse in A.

5.4. MV-Binding an T-Zellen interferiert mit CD3/CD28 stimulierter Aktivierung von F-Aktin und Membranexpansion

Um zu untersuchen, ob die durch WTF-Bindung induzierte Veränderung in der GTP-Beladung der Rho GTPasen einen Einfluss auf die CD3/CD28 stimulierte Aktivierung von F-Aktin hat, wurden WTF bzw. mock-behandelte T-Zellen für 2 h, bei 4°C inkubiert und für 10 min bei 37°C auf costimulatorischen Objektträgern aktiviert. Auf den mikroskopischen Aufnahmen (**Abb. 5.6.**) ist zu erkennen, dass mock-behandelte T-Zellen das typische stark aktivierte F-Aktin und ausgedehnte Strukturen von Lamellipodien (Pfeil in **A**) an den Rändern ausbilden, welche die planare Struktur auf den Antikörper-beschichteten Objektträger vorwärts treibt. Dagegen zeigen WTF-behandelte T-Zellen eine andere Morphologie. Die Form ist unregelmäßig und die Ausbildung der Lamellipodien-Strukturen ist deutlich reduziert. Zu erkennen ist das vermutlich nicht vollständig reaktivierte F-Aktin (Pfeil in **B**).

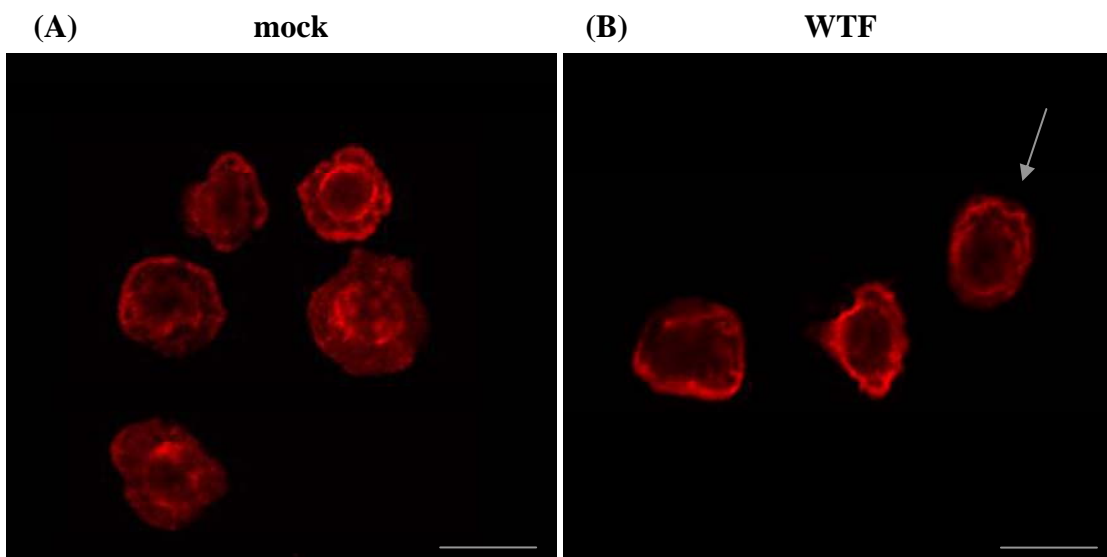
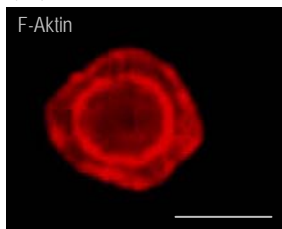


Abb. 5.6.: WTF-Bindung an T-Zellen verhindert eine vollständige Polymerisierung von F-Aktin nach CD3/CD28 Ligation. T-Zellen wurden für 10 min durch CD3/CD28 Ligation aktiviert, die Stimulation wurde durch Zugabe von 4 % PFA beendet, permeabilisiert und mit Phalloidin-Alexa594 gefärbt. **(A)** Mock-behandelte Zellen zeigen polymerisiertes F-Aktin und weite Ausdehnung der Membran. **(B)** F-Aktin WTF-behandelter Zellen (MOI 1) ist unvollständig polymerisiert und die Zellen sind nur wenig verbreitert. (Maßstab 10 µm)

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die MV-Bindung auf die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien hat, wurden ED oder WTF-behandelte T-Zellen zusätzlich zur F-Aktin Färbung mit einem humanen MV Serum gefärbt (**Abb. 5.4**). Die Kontrollzelle in **Abb. 5.4.A** zeigt gleichmäßig radial ausgedehnte Lamellipodien-Strukturen. Dagegen weisen MV-gebundene Zellen deutlich reduzierte Lamellipodien und ungleichmäßige Membranausdehnungen auf (**Abb. 5.4.B**). Das gelbe Überlagerungssignal zeigt durch die MV-Bindung polymerisiertes F-Aktin. Offenbar scheint bereits die lokale Bindung von MV an die Zelloberfläche den Umbau des Zytoskeletts drastisch zu beeinflussen.

(A) mock



(B) MV

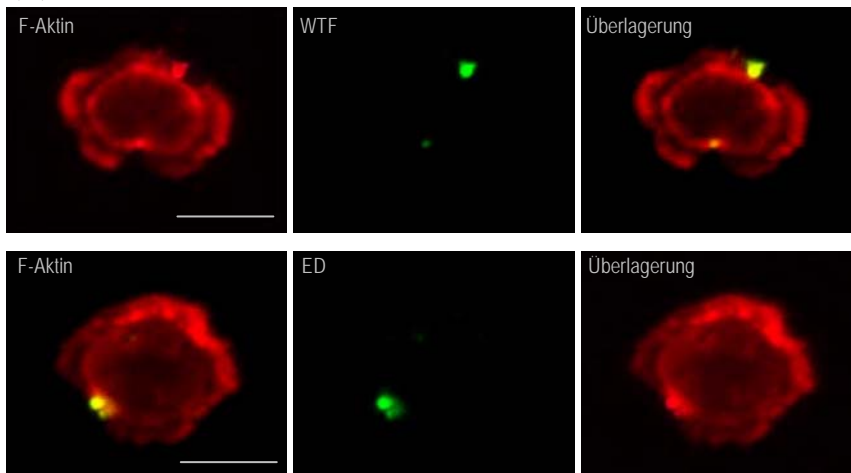


Abb. 5.7.: Colokalisation von MV mit F-Aktin in CD3/CD28 costimulierten T-Zellen. Wie bereits beschrieben, wurden die Zellen mit mock (**A**) bzw. MV (**B**) inkubiert, für 10 min aktiviert, mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert und mit Phalloidin-Alexa594 und einem MV Serum gefärbt. Colokalisation von MV mit F-Aktin erscheint als gelbes Überlagerungssignal. (Maßstab 5 µm)

Diese unvollständige Reorganisation von F-Aktin sollte auch zu einer verminderten Adhäsion von T-Zellen führen, da eine vollständige Aktivierung des Zytoskelettes essentielle Voraussetzung für Adhäsion ist. Aus **Abb. 5.8.** geht hervor, dass WTF-behandelte T-Zellen auf Antikörper-beschichteten Objektträgern zu ca. 60 % weniger effizient adhären als mock-behandelte Kontrollzellen. Die Fähigkeit zur Adhäsion von Leukozyten ist eine wichtige Eigenschaft von T-Zellen. Adhäsion resultiert aus der Interaktion des Zytoskeletts mit Proteinen der Extrazellulärmatrix und beinhaltet Rezeptor-vermittelte Prozesse, welche mit der Aktivierung von Integrinen verbunden sind. Daher wurde die Integrin-vermittelte Aktivierung und Polarisierung untersucht und ist im nachfolgendem Ergebnisteil beschrieben.

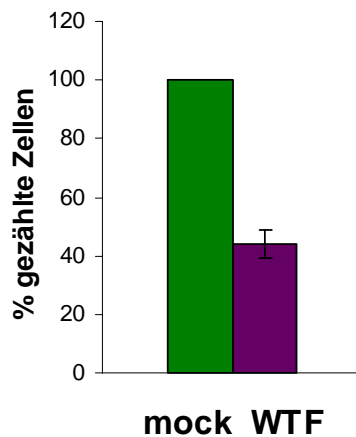


Abb. 5.8.: Adhäsion WTF-behandelter T-Zellen ist auf Antikörper-beschichteten Objektträgern drastisch reduziert. F-Aktin gefärbte T-Zellen von zehn gleich großen Mikroskopfelder wurden ausgezählt. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Mindestens 200 Zellen pro Färbung wurden gezählt.

5.5. WTF beeinflusst T-Zell-Polarisierung und Adhärenz auf Fibronektin

Eine weitere sehr wichtige Eigenschaft von Leukozyten, bei der dem Zytoskelett eine essentielle Bedeutung zukommt, ist die Fähigkeit zur Polarisierung und Migration von T-Zellen. Um zu untersuchen, ob die Bindung von WTF an T-Zellen die Polarisierung der

Zellen beeinflusst, wurden mock- bzw. WTF- behandelte Zellen auf Plasmafibronektin-beschichtete Objektträger gegeben. Fibronektin ist ein Bestandteil der Extrazellulärmatrix. Durch Interaktion von β -Integrinen auf der Oberfläche von T-Zellen mit Fibronektin wird die T-Zell-Polarisierung induziert. **Abb. 5.9.A** zeigt zwei Beispiele für mock-behandelte T-Zellen. Migrierende T-Zellen zeigen amöboide Morphologien. Der Pfeil in **Abb. 5.9.A** gibt die Bewegungsrichtung der T-Zelle an. Diese Form wird als „Handspiegel“ bezeichnet, welche sich aus drei unterschiedlichen Kompartimenten zusammensetzt, der führenden Front, mit einem hohen Gehalt an F-Aktin, dem Hauptkörper mit dem Zellkern und der hinteren Projektion, dem Uropod, der die motilen Zelle vorwärts treibt.

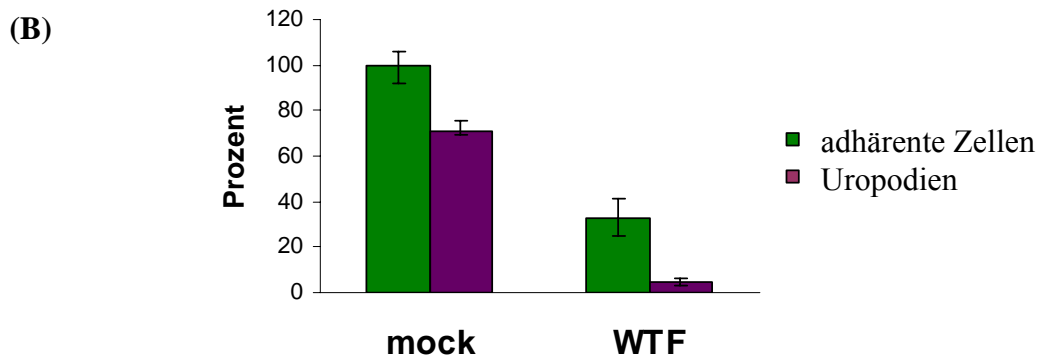
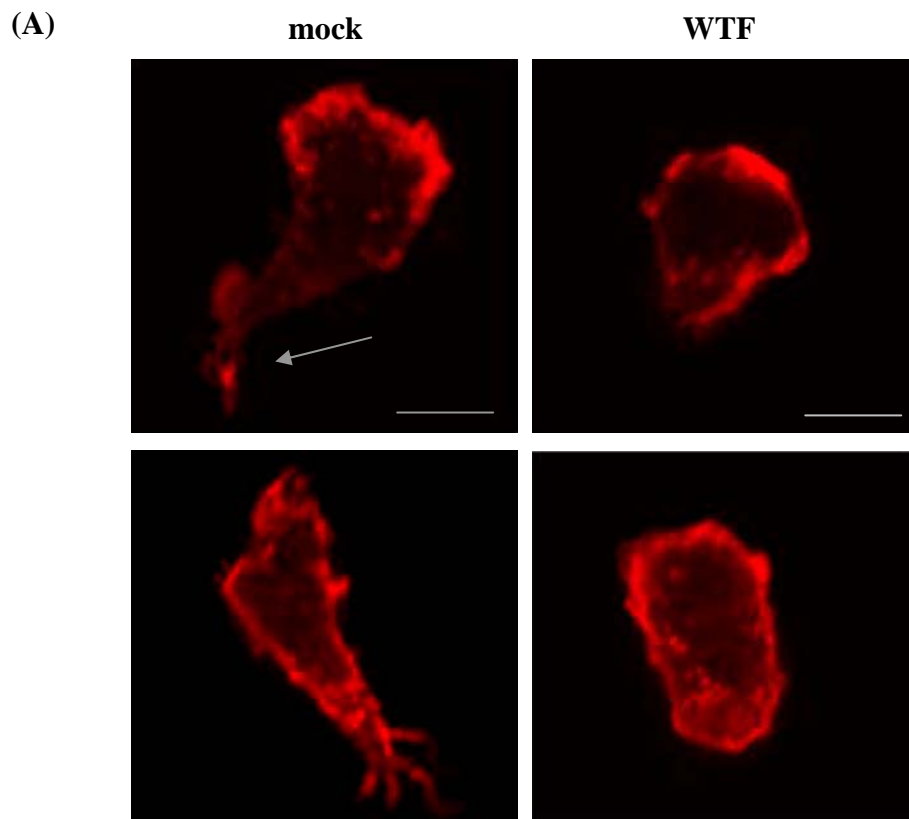


Abb. 5.9.: Polarisierung von T-Zellen ist in WTF-behandelten Zellen drastisch gestört. (A) T-Zellen wurden mit mock bzw. WTF inkubiert und für 30 min auf Fibronectin-beschichteten Objektträger aktiviert. Anschließend wurde mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert, mit Phalloidin-Alexa594 das F-Aktin gefärbt und mikroskopisch analysiert (Maßstab 5 µm). **(B)** Quantitative Auswertung der polarisierenden T-Zellen. Ausgezählt wurden 10 gleich große Mikroskopfelder. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

WTF inkubierte T-Zellen zeigen zwar ein teilweise polymerisiertes F-Aktin, aber die Morphologie unterscheidet sich deutlich von der der Kontrollzellen, die Ausbildung des Uropods ist deutlich reduziert. Die quantitative Auswertung in **Abb. 5.9.B** zeigt, dass WTF-behandelte Zellen nahezu vollständigen (>70 %) Verlust an Uropodien aufweisen. Eine unvollständige T-Zell-Polarisierung kann signifikante Folgen für die Funktion von T-Zellen *in vivo* haben, da die Fähigkeit zur Migration eine essentielle Eigenschaft von Leukozyten ist. Eine weitere Möglichkeit zur Visualisierung von motilen T-Zellen (*live cell imaging*) wird in **Abb. 5.11.** gezeigt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob LFA-1 in WTF-behandelten T-Zellen aktiviert werden kann. LFA-1 spielt eine Hauptrolle in der Initiierung der Immunantwort, indem das Protein die adhäsive Verbindung des Kontaktes von T-Zellen mit APC in der immunologischen Synapse vermittelt. Eine Aktivierung von LFA-1 kann induziert werden durch, (i) stimulatorische LFA-1 Antikörper, (ii) durch andere stimulatorische Antikörper oder (iii) durch bivalente Kationen, wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} . Die Aktivierung von LFA-1 führt zu konformationellen Änderungen in der Ectodomäne von Integrinen, wodurch die Affinität zu ICAM-1 deutlich erhöht wird. Die Aktivierung von LFA-1 auf T-Zellen resultiert erst in Adhäsion auf immobilisiertem ICAM-1, im weiteren Verlauf zur starken Adhäsion, morphologischen Änderungen und dann zur Migration. Dieser Prozess tritt 30–40 min nach LFA-1 Aktivierung auf und hängt komplett von einem funktionellen Zytoskelett ab. Zur Untersuchung der LFA-1 Aktivierung wurde ein T-Zell-Adhäsionsassay verwendet. Dafür wurden T-Zellen mit dem Lebendfarbstoff Calcein gefärbt, mit mock und WTF inkubiert, die Zellen zu Platten-gebundenen ICAM-1/Fc zugegeben und LFA-1 durch Zugabe von 200 µM Mn^{2+} 45 min aktiviert. Abschließend wurden nicht-adhärente Zellen durch Waschen entfernt und der prozentuale Anteil adhätierender Zellen durch Messung der Fluoreszenz bei 520 nm bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 5.10.** dargestellt.

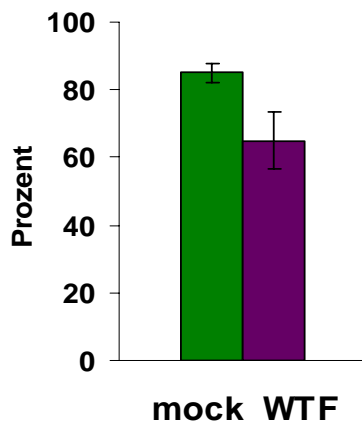


Abb. 5.10.: LFA-1 Aktivierung WTF-behandelte T-Zellen ist nur geringfügig reduziert. Die Adhäsion wurde durch 200 μM Mn^{2+} für 45 min aktiviert. Die nicht-adhären Zellen wurden durch Waschen entfernt und die Menge adhärerender Zellen durch Fluoreszenzmessung bestimmt.

WTF-behandelte Zellen zeigen eine um ~20 % erniedrigte Adhärenz gegenüber der Kontrolle. Das ist ein im Vergleich drastisch reduzierten Adhärenz auf Fibronectin nur geringfügiger Unterschied. Aber es könnte möglicherweise erklären, dass in der Anzahl Konjugat-bildender Zellen WTF-behandelter T-Zellen mit DCs keine Beeinträchtigung zu finden ist (**Abb. 5.19.**). Das ist möglicherweise auch auf die unterschiedlichen Assay Bedingungen zurückzuführen. Außerdem führt Fibronectin zu einer Aktivierung von diversen β 1-Integrinen, der Adhäsions-assay auf immobilisierten ICAM-1/Fc ist ein spezifisches System zur Messung von aktiviertem β 2-Integrinen.

5.6. Effekt MV-infizierter Zellen auf die Morphologie und Geschwindigkeit von T-Zellen **(live cell imaging)**

Live cell imaging ist eine Methode, um z. B. morphologische Veränderungen lebender Zellen in Echtzeit zu visualisieren und zu untersuchen. Dafür wurden persistierend mit ED infizierte Zellen (U251-EDp) verwendet, welche zu 100 % auf der Oberfläche virale Glykoproteine exprimieren (nicht gezeigt). Am Vortag wurden T-Zellen mit einem eGFP-Aktin-Plasmid transfiziert und in das Kammerdeckglas nicht-infizierte Zellen (U251) bzw. ED-infizierte Kulturen (U251-EDp) ausgesät. Das Kammerdeckglas mit dem Zellrasen wurde auf einen beheizbaren Mikroskopobjekttisch platziert, durch den die Zellen bei 37°C gehalten werden können. Pro Kammer wurden eGFP-Aktin transfizierte T-Zellen zu nicht-infizierten Zellen bzw. ED-infizierten Kulturen hinzugefügt. Zur Verhinderung der Membranfusion enthielt das Kulturmedium FIP. Unmittelbar nach Zugabe der T-Zellen, wurde die Messung gestartet und in Verlauf von 30 min im Abstand von 3 min jeweils ein Bild aufgenommen (**Abb. 5.11.**).

Die Aufnahmen der mock-Zellen zeigt, dass sich T-Zellen nach Kontakt mit den Zellrasen bewegen und Uropodien ausbilden (Pfeil in **Abb. 5.11.A**). Dagegen zeigen T-Zellen nach Kontakt mit MV-infizierten Zellen (**Abb. 5.11.B**) eine deutliche reduzierte Motilität und fehlende Uropodienbildung.

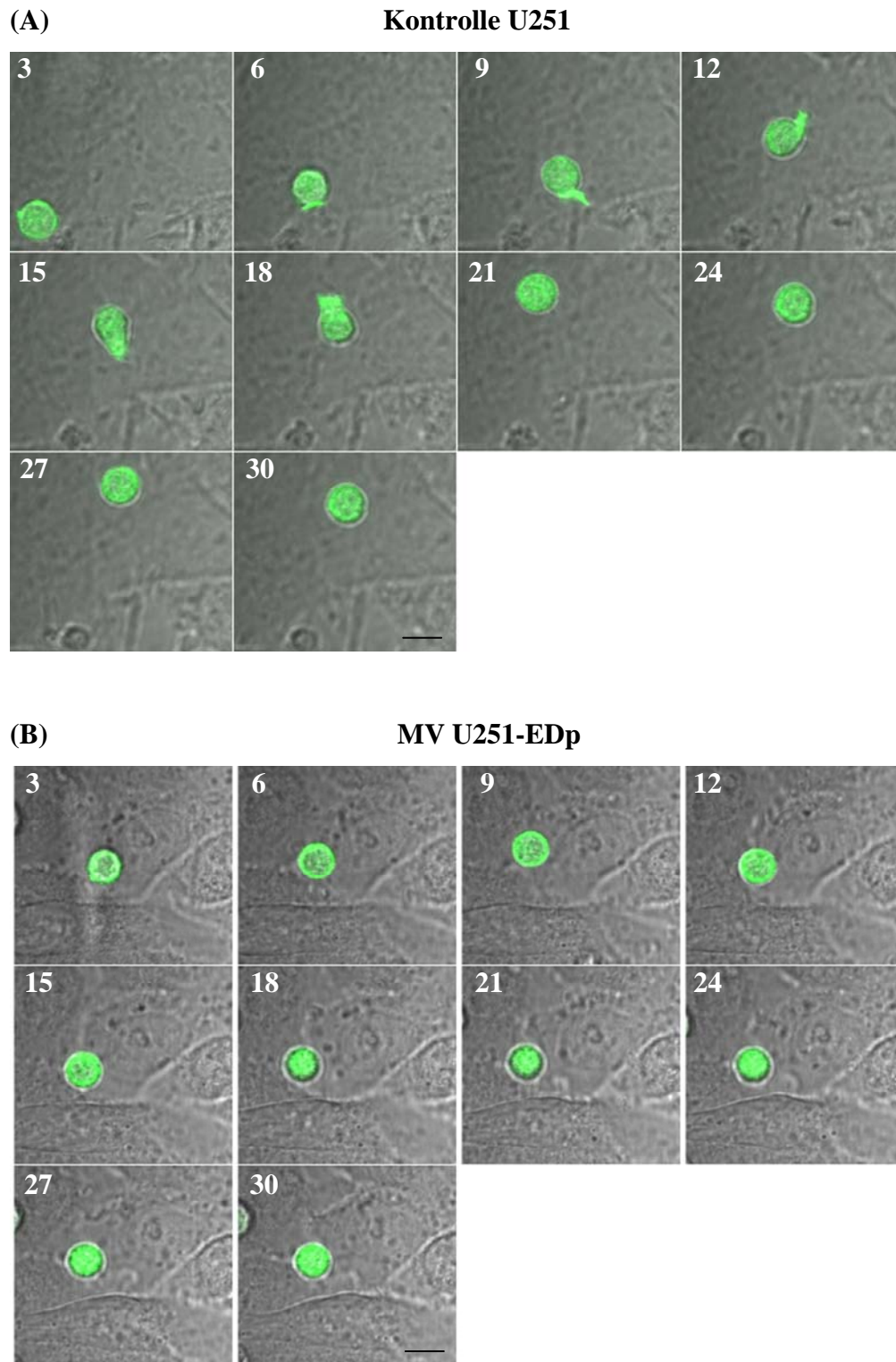


Abb. 5.11.: Die Morphologie und Migration von T-Zellen auf persistierend ED-infizierten Zellen (U251-EDp) ist verlangsamt. Die Bilder sind Überlagerungen aus dem GFP-Signal (grün) eGFP-transfizierter T-Zellen und DIC Aufnahmen des Zellrasens. **(A)** nicht-infizierte U251 Zellen und **(B)** ED-infizierte U251p Zellen. Zellen und Medium (FIP) wurden auf 37°C vorgewärmt und die Migration und morphologischen Veränderungen über einen Zeitraum von 30 min beobachtet. (Maßstab 5 µm)

Zusätzlich wurde die Geschwindigkeit mit einer am Institut programmierten Software analysiert. **Abb. 5.12.** zeigt, dass MV-infizierte Zellen die Migrationsgeschwindigkeit von T-Zellen um ~2.5-fache reduzieren gegenüber nicht-infizierten Zellen.

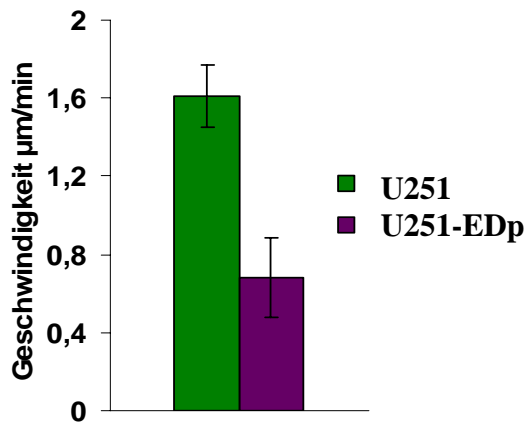


Abb. 5.12.: Der Kontakt mit MV-infizierten Zellen reduziert drastisch die Geschwindigkeit der T-Zellen. Dargestellt ist die Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ 30 analysierter Zellen.

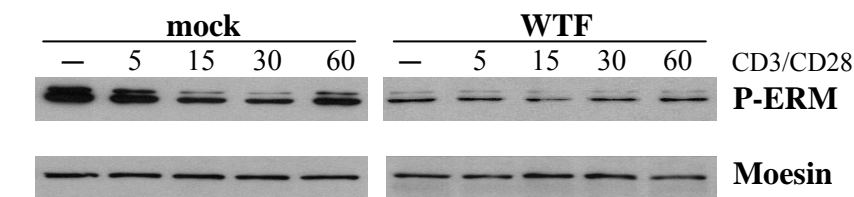
5.7. WTF reduziert drastisch die Ausbildung Mikrovilli-ähnlicher Strukturen

Ezrin-Radixin-Moesin (ERM-Proteine) funktionieren als Linker zwischen der Plasmamembran und dem F-Aktin Zytoskelett und sind involviert in Zelladhäsion, Mikrovilli-Strukturen und Lamellipodien-Bildung. Phosphorylierung von ERM-Proteinen an C-terminalen Aminosäureresten (Thr567 für Ezrin, Thr564 für Radixin, Thr558 für Moesin) bewirkt eine offene, stabilisierte Konformation, die die Assoziation der Plasmamembran mit dem Zytoskelett ermöglicht (124). Einige Rho GTPasen (Rac1 und RhoA) sind vermutlich in die Ausbildung von Mikrovilli-Strukturen in einigen Zelltypen, unter anderem auch in Lymphozyten, involviert (151,152). Mikrovilli sind spezialisierte periphere Strukturen auf der Oberfläche vieler Zelltypen und spielen bei Adhäsionsvorgängen von Lymphozyten eine kritische Rolle. Da sowohl die Adhärenz als auch die Ausbildung von Lamellipodien in WTF-behandelten T-Zellen gestört ist, wurde der Einfluss der WTF-Bindung an die Membran hinsichtlich der Fähigkeit zur Formation von Mikrovilli-Strukturen und die Phosphorylierung der ERM-Proteine untersucht.

5.7.1. WTF beeinflusst die Phosphorylierung von Membranlinkerproteinen

Zur Untersuchung der Phosphorylierung von ERM-Proteine wurden T-Zellen gemäß dem beschriebenen Protokolle costimuliert. Anschließend wurden die Zellen unmittelbar in 2 x SDS-Gelladepuffer in der Platte lysiert und die Proben über WB Analyse analysiert und mit einem P-ERM spezifischen Antikörper detektiert (**Abb. 5.13.**). Zusätzlich zu stimulierten T-Zellen wurden Lysate nicht-stimulierter Zellen untersucht. Da ERM-Proteine das Aktin-Zytoskelett mit Membranrezeptoren verbinden, weisen nicht-stimulierte T-Zellen bereits einen hohen Phosphorylierungsgrad auf, welcher nach Stimulation mit Chemokinen, CD3 und durch APCs abnimmt (152, 153).

(A)



(B)

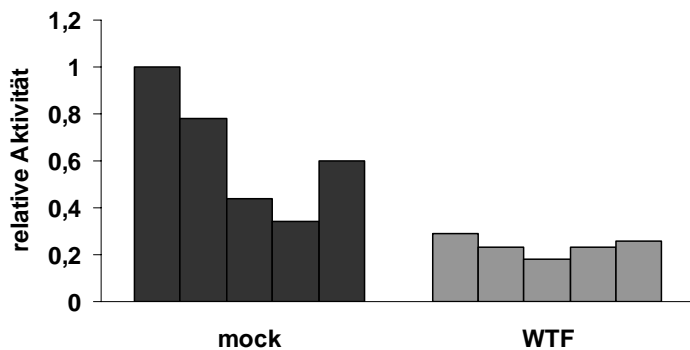


Abb. 5.13.: Bindung von WTF an T-Zellen verändert die Phosphorylierung der Zytoskelett-Linkerproteine ERM in CD3/CD28 stimulierten Zellen. (A) Mock- bzw. WTF-behandelte T-Zellen wurden durch CD3/CD28 Ligation für die angegebenen Zeitpunkte costimuliert, durch Zugabe von 2 x SDS-Gelladepuffer lysiert. Je 40 µl der Zelllysate wurden über ein 10 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit einem P-ERM Antikörper durch Western Blot Analyse detektiert (75-80 kDa). Zusätzlich wurden 40 µl pro Lysat als Proteinladekontrolle aufgetragen und mit einem Moesin Antikörper (75 kDa) nachgewiesen. (B) Quantitative Analyse des WB in A.

Wie **Abb. 5.13.A** gezeigt, führt die CD3/CD28 induzierte Costimulation zu einer Erniedrigung der ERM-Phosphorylierung und steigt nach einer Stunde wiederum auf ein Basalniveau an. Dagegen zeigen T-Zellen, die mit WTF inkubiert wurden, einen konstant niedrigen Phosphorylierungsgrad.

5.7.2. WTF-Bindung an T-Zellen reduziert drastisch die Formation Mikrovilli-ähnlicher Strukturen

Wie in **Abschn. 5.6.1.** gezeigt, verändert die Bindung von WTF an T-Zellen die Phosphorylierung von ERM-Proteinen. Da ERM-Proteine die Bildung von Mikrovilli regulieren, sollte der veränderte Phosphorylierungsstatus die Formation dieser Strukturen beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden T-Zellen mit mock- bzw. WTF inkubiert, auf Objektträgern durch CD3/CD28 Ligation für 15 min costimuliert, mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert und mit P-ERM Antikörper und Phalloidin-Alexa594 F-Aktin gefärbt. Da aus der Literatur für das angewandte Stimulationsprotokoll keine Untersuchung mit P-ERM Antikörpern bekannt ist, und somit nicht geklärt ist, ob es sich bei den in **Abb. 5.14.** dargestellten Strukturen tatsächlich um Mikrovilli handelt, werden diese im folgenden als Mikrovilli-ähnliche Strukturen bezeichnet. Die konfokalen Aufnahmen zeigen, dass die Ligation von CD3/CD28 auf Platten-gebundenen Objektträgern in Kontrollzellen zu der bereits beschriebenen Aktivierung, Umlagerung des F-Aktin Zytoskeletts und zur Ausbildung radialer Mikrovilli-ähnlicher Strukturen führt, in denen phosphorylierte ERM-Proteine konzentriert sind (**Abb. 5.14.A**).

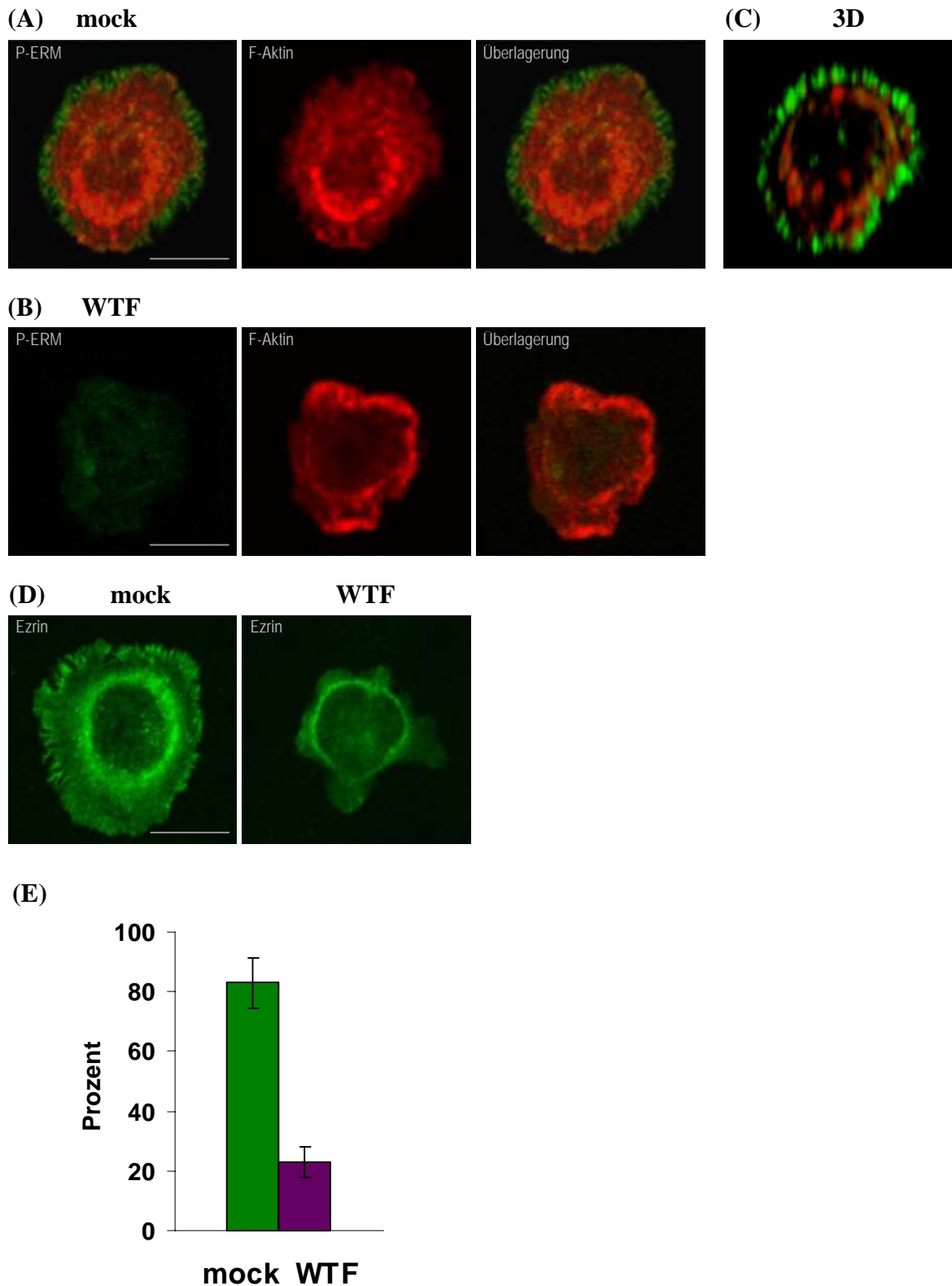


Abb. 5.14.: WTF Bindung an T-Zellen beeinflusst drastisch die Formation Mikrovilli-ähnlicher Strukturen. T-Zellen wurden auf Objektträger durch CD3/CD28 Ligation für 15 min costimuliert, mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert und mit P-ERM Antikörper und Phalloidin-Alexa594 gefärbt und mikroskopisch analysiert. Mock-behandelte Kontrollzellen (A) zeigen radial lokalisierte Mikrovilli-

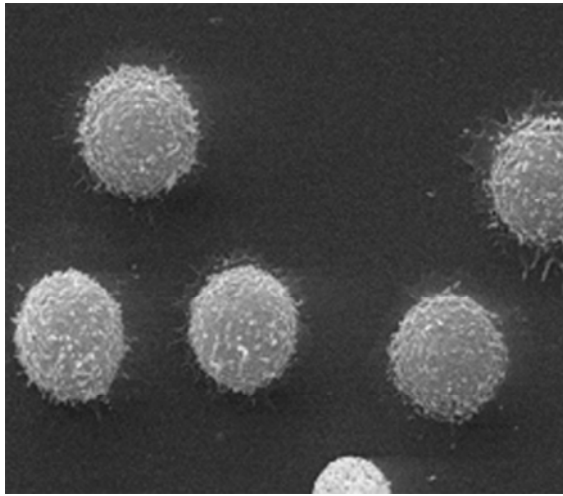
ähnliche Strukturen, die in den WTF-behandelten T-Zellen (**B**) fehlen. (**C**) 3-dimensionale Darstellung der Zelle in A. (**D**) Die Zellen wurden behandelt wie in A und B und mit einem Ezrin Antikörper gefärbt. (**E**) Quantitative Auswertung der mikroskopischen Analyse in A. Ausgewertet wurden 10 gleich große Mikroskopfelder. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (Maßstab 5 µm)

Wie im Überlagerungsbild gut zu erkennen ist, umgeben diese feinen peripheren Prozesse sternförmig die Filopodien des aktivierten F-Aktins. Die radial angeordneten Strukturen sind nicht gleichmäßig über die Oberfläche der T-Zellen verteilt, sondern sind nur am Ende der flachen Membranausdehnungen lokalisiert wie die 3D-Rekonstruktion in **Abb. 5.14.D** zeigt. In diesem planaren Bereich ist die Zelle im direkten, festen Kontakt mit den Platten- gebundenen Antikörpern und möglicherweise vermitteln die gebildeten Strukturen Adhäsionsprozesse. Dagegen zeigen mit WTF inkubierte T-Zellen deutlich morphologisch Unterschiede. Die F-Aktin Färbung WTF-behandelter Zellen in **Abb. 5.14.B** zeigt, wie bereits in **Abschn. 5.3.** beschrieben, keine Ausbildung von Filopodien und gestörte Lamellipodien- Formation. Des weiteren weist die Zelle keine Mikrovilli-ähnlichen Strukturen auf. Die Signalintensität der phosphorylierten ERM-Proteine ist verglichen mit der der Kontrollzelle ebenfalls reduziert. Nur etwa 20 % der WTF-behandelten Zellen bilden radial angeordnete periphere Prozesse aus. Wahrscheinlich verursacht das Fehlen der Mikrovilli-ähnlichen Strukturen die deutlich erniedrigte Adhärenz WTF-behandelter T-Zellen. Die zusätzlichen Färbungen mit einem Ezrin-spezifischen Antikörper (**Abb. 5.134.C**) zeigen, dass Ezrin, ein Bestandteil der ERM-Proteine in mock-behandelten Zellen in den Mikrovilli-ähnlichen Strukturen lokalisiert bzw. in WTF-behandelten Zellen deutlich weniger ausgeprägt ist.

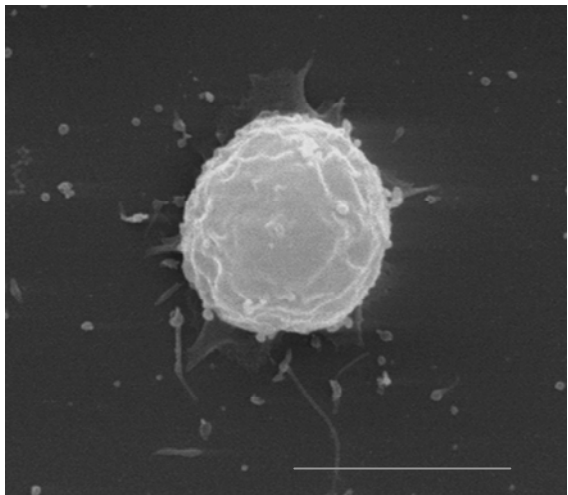
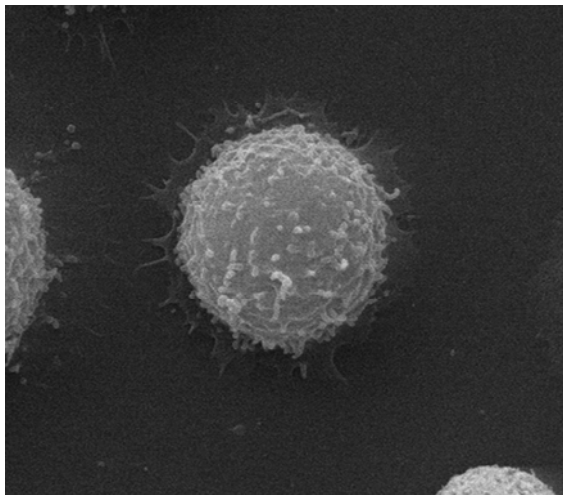
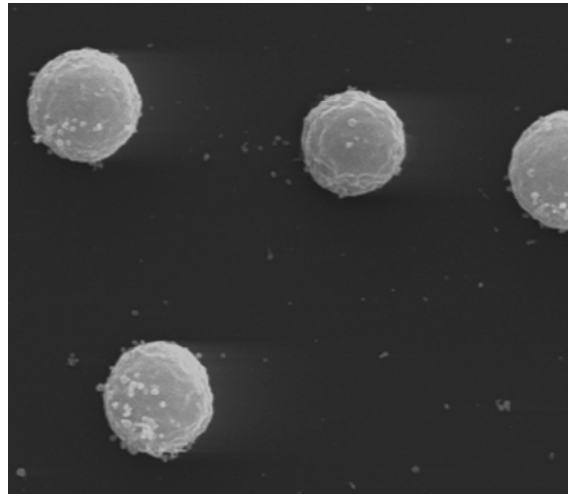
5.7.3. Rasterelektronenmikroskopische Analyse WTF-behandelter T-Zellen

Da Rho GTPasen und ERM-Proteine die Ausbildung von Mikrovilli regulieren, wurde untersucht, ob die WTF-Bindung die Ausbildung dieser Strukturen verändert. Dafür wurden T-Zellen mit mock bzw. WTF behandelt, entweder auf Poly-L-Lysin adhärirt oder durch CD3/CD28 Ligation für 10 min costimuliert und mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Die CD3/CD28 costimulierten Kontrollzellen in **Abb. 5.15.A** zeigen ausgeprägte Lamellipodien-Strukturen mit radial angeordneten filopodialen Strukturen in den Rand- bereichen (87 %).

(A) nicht-stimuliert
mock

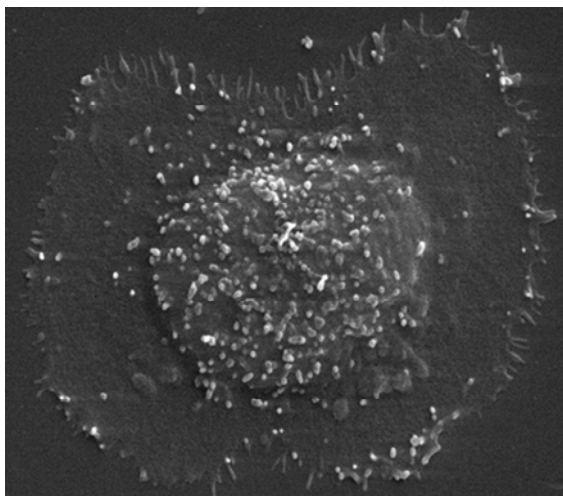


WTF

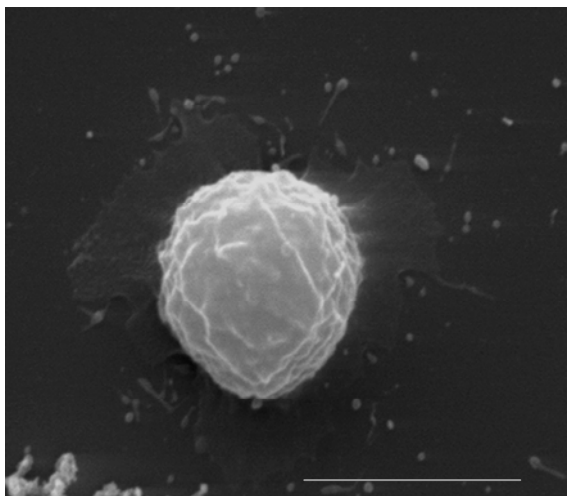


(B) CD3/CD28

mock



WTF



(C)

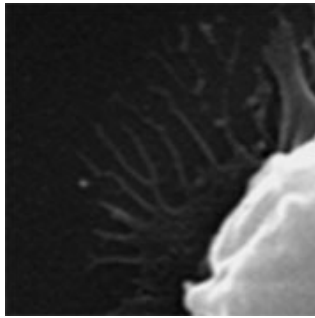


Abb. 5.15.: Bindung von WTF an T-Zellen induziert Verlust von Mikrovilli in CD3/CD28 costimulierten Zellen. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden nicht-stimulierte (A) oder für 10 min CD3/CD28 costimulierte T-Zellen (B) mit mock- bzw. WTF behandelt und mit 6.25 % Glutaraldehyd fixiert (7000fach, Maßstab 5 µm). (C) Bei den in WTF-behandelten Zellen auftretenden filopodalen Strukturen, handelt es sich möglicherweise um *retraction fibres*.

Im zentralen Hauptkörper sind deutlich die Mikrovilli-reichen Strukturen zu erkennen. Dagegen zeigen WTF-behandelte Zellen (Abb. 5.15.B) nur unzureichend ausgebildete Lamellipodien (11 %) und weisen einen dramatischen Verlust an Mikrovilli auf. Die Oberfläche der Zelle ist glatt und erscheint runder, kugelig als die Oberfläche der Kontrollzellen. Die radial angeordneten filopodalen Randstrukturen fehlen. Übereinstimmend mit der reduzierten CD3/CD28 induzierten GTP-Beladung von Cdc42 und Rac1 oder der Stabilisierung des F-Aktins, und damit verbundenen morphologischen Veränderungen, sind in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Lamellipodien- und Filopodien-Strukturen zu sehen. Einige WTF-behandelte Zellen zeigen filopodale Strukturen, bei denen es sich möglicherweise um *retraction fibres* handelt (Abb. 5.15.C).

5.8. WTF-Bindung an T-Zellen führt zur Aktivierung von F-Aktin in nicht-stimulierten Zellen

Die Inkubation von T-Zellen mit WTF für zwei Stunden bei 37°C in Abwesenheit von Stimulation induziert eine leichte Aktivierung von F-Aktin. Das F-Aktin Zytoskelett von nicht-stimulierten mock-behandelten T-Zellen ist ringförmig akkumuliert und nur schwach im Zytoplasma verteilt (Abb. 5.16.). Dagegen zeigen WTF-behandelte T-Zellen eine deutliche Zunahme an polymerisiertem F-Aktin. Eine ähnliche Aktivierung von F-Aktin wird auch durch

MV ED induziert (nicht gezeigt). Die Signalintensität von Phalloidin-Alexa594 ist erhöht und es sind morphologischen Veränderungen, aber keine peripheren Membranausdehnungen zu beobachten. Es treten keine Unterschiede in der Anzahl adhärierender mock- bzw. MV-behandelter T- Zellen auf.

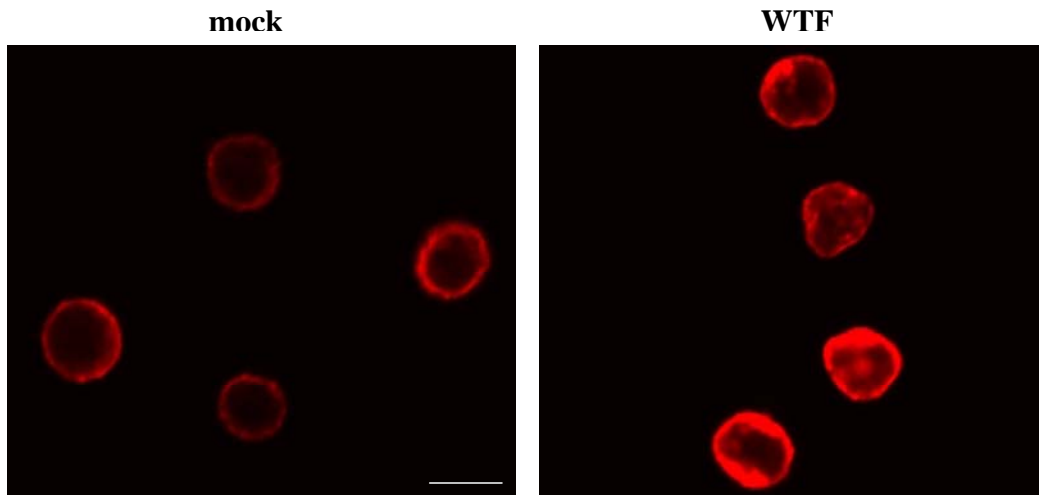


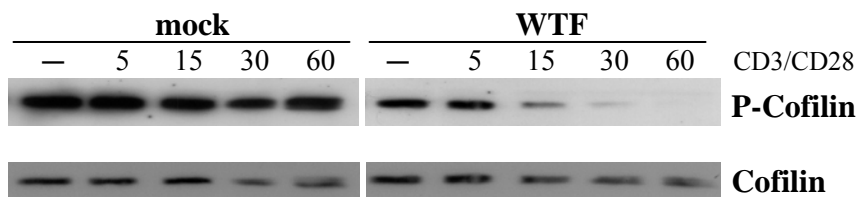
Abb. 5.16.: Die Bindung von WTF an nicht-stimulierte T-Zellen aktiviert F-Aktin. T-Zellen wurden mit mock bzw. WTF für 1 h bei 37°C (FIP) inkubiert und für 5 min auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern adhärirt, mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert und F-Aktin mit Phalloidin-Alexa594 gefärbt. (Maßstab 5 µm)

5.9. WTF-Bindung induziert die Aktivierung von Cofilin

Eine Verbindung zwischen T-Zell-Costimulation und Reaktivierung des Aktin-Zytoskelettes ist Cofilin, ein Protein, dass zur Familie der kleinen Aktin-bindenden Proteine gehört. Cofilin bindet sowohl globuläres als auch filamentöses Aktin und induziert Aktin-Depolymerisierung. Somit spielt Cofilin eine wichtige Rolle in Prozessen, die zur Aktin-Umlagerung führen, und es generiert neue Monomere durch Depolymerisierung von F-Aktin. Da Cofilin an dynamischen Umlagerungen des Zytoskeletts beteiligt ist und durch Costimulation aktiviert werden kann, wurde untersucht, inwieweit die Bindung von WTF an die T-Zell-Membran die die Polymerisierung von F-Aktin reduziert und die Aktivität von Cofilin beeinflusst. Im Gegensatz zu vielen anderen Signalmolekülen wird Cofilin durch Phosphorylierung negativ

reguliert. Dephosphorylierung an einem Serinrest in Position 3 führt zur Aktivierung des Cofilins, und zur transienten Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett. Zur Untersuchung der Cofilin-Aktivierung wurden T-Zellen mit mock bzw. WTF inkubiert, durch CD3/CD28 Ligation für verschiedene Zeitpunkte costimuliert, anschließend rasch lysiert, die erhaltenen Zelllysate über ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt und das Protein mit einem spezifischen Anti-P-Cofilin Antikörper im Western Blot detektiert (**Abb. 5.17.**). In den Kontrollzellen ist nur eine leichte Dephosphorylierung von Cofilin nach 30 min CD3/CD28 Costimulation festzustellen, was vergleichbar mit Literaturdaten ist (111). Dagegen ist Cofilin in WTF-behandelten Zellen nach 15 min CD3/CD28 Ligation signifikant dephosphoryliert und damit aktiviert.

(A)



(B)

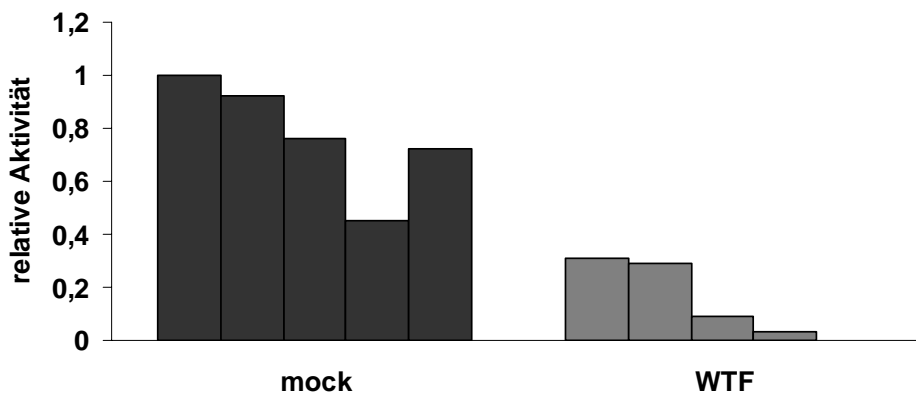


Abb. 5.17.: WTF-Bindung an T-Zellen verändert die Aktivität von Cofilin. (A) Mock bzw. WTF-behandelte T-Zellen wurden durch CD3/CD28 Ligation für die angegebenen Zeitpunkte costimuliert, durch Zugabe von 2 x SDS-Gelladepuffer lysiert und je 40 µl der Zelllysate über ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt und das phosphorylierte Protein mit einem P-Cofilin Antikörper durch Western Blot Analyse detektiert (~19 kDa). Zusätzlich wurden 40 µl pro Lysat als Proteinladekontrolle aufgetragen und mit einem Cofilin Antikörper nachgewiesen. (B) Quantifizierung des WB in A.

Die mikroskopischen Aufnahmen in **Abb. 5.18.** zeigen ein ähnliches Ergebnis. In mock-behandelten CD3/CD28 costimulierten Zellen colokalisiert polymerisiertes F-Aktin mit P-Cofilin in den Lamellipodien-Strukturen (**Abb. 5.18.A**). Dagegen enthalten WTF-behandelte Zellen, in denen F-Aktin unvollständig polymerisiert ist, dephosphoryliertes Cofilin (**Abb. 5.18.A**).

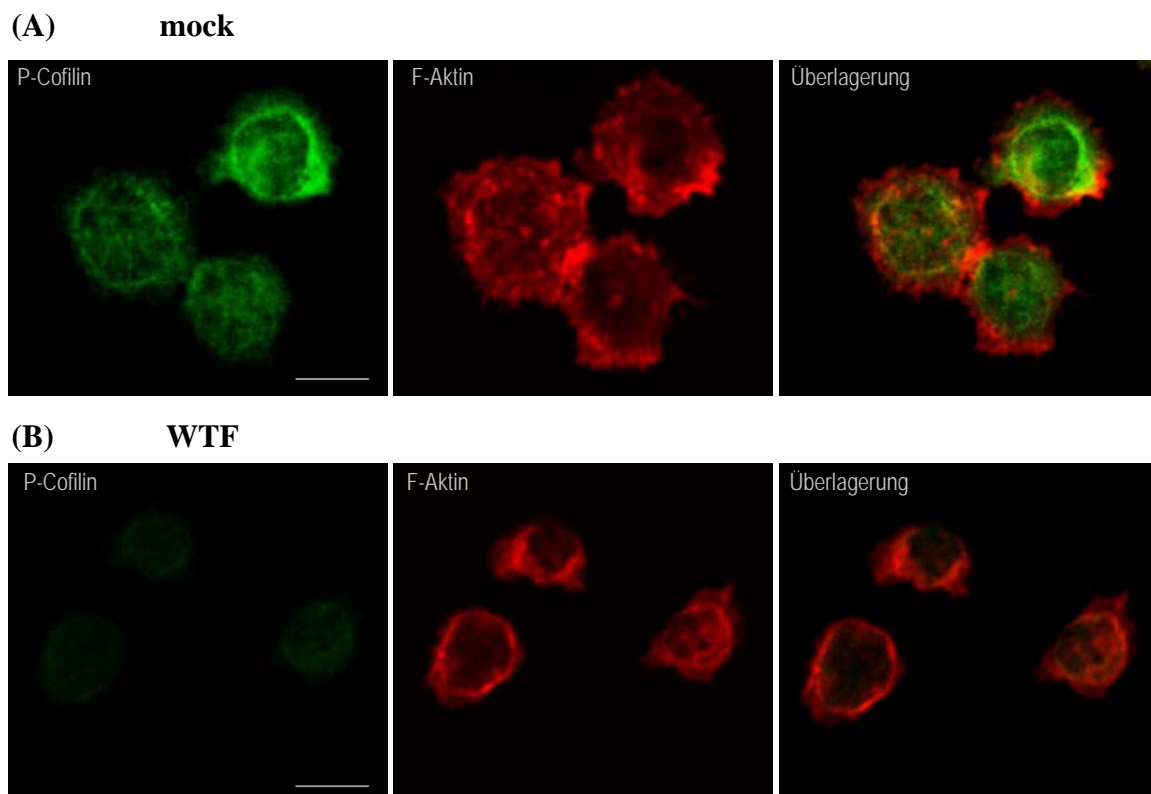
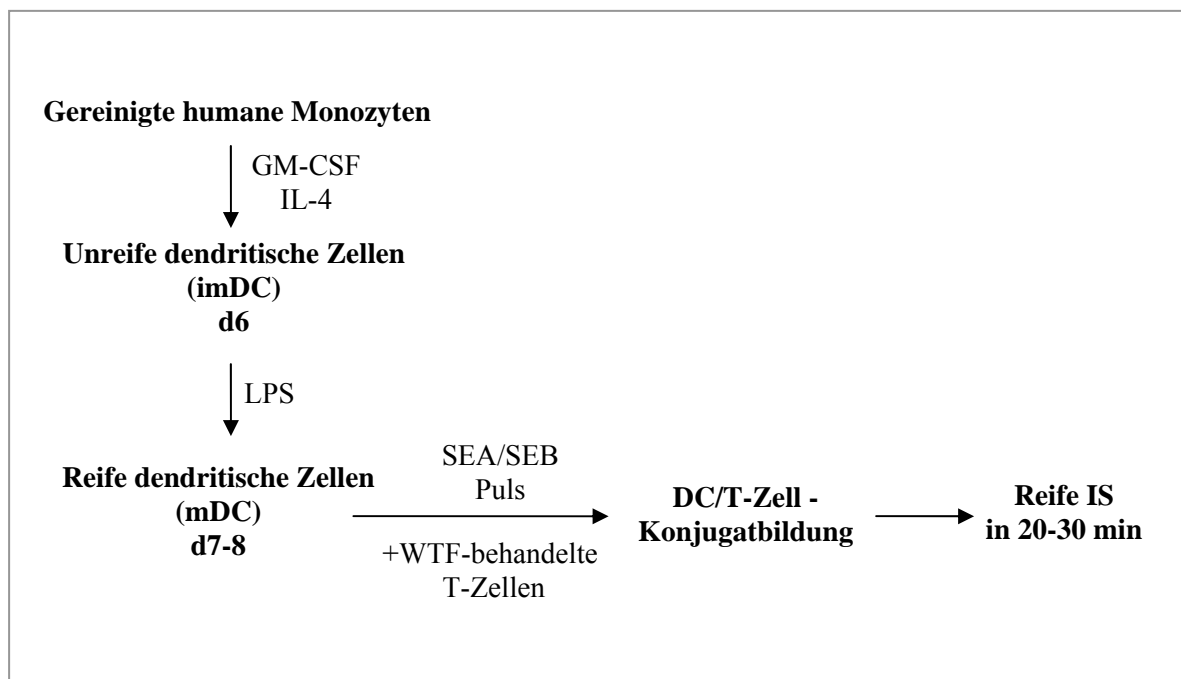


Abb. 5.18.: Konfokale Analyse von P-Cofilin in mock- bzw. WTF-behandelten T-Zellen. T-Zellen wurden mit mock (A) bzw. WTF (B) inkubiert, durch CD3/CD28 Ligation für 15 min costimuliert, fixiert, permeabilisiert und mit P-Cofilin Antikörper und Phalloidin-Alexa594 gefärbt. (Maßstab 5 μ m)

5.10. WTF stört die Ausbildung einer reifen immunologischen Synapse

Durch initiale TCR Signale induzierte Aktin-Zytoskelett Umlagerungen sind wichtig für die Stabilität von APC/T-Zell-Interaktionen und für die Reifung der immunologischen Synapse (IS). Die Konjugatbildung zwischen T-Zelle und APC rekrutiert eine Reihe von

Rezeptoren und Signalmolekülen in die Kontaktzone, die von einem funktionsfähigem Zytoskelett abhängen. In **Abschn. 5.2.** wurde gezeigt, dass die Bindung von WTF an die Membran von T-Zellen zur einer deutlich reduzierten Aktivierung von F-Aktin in TCR-stimulierten Zellen führt. Deshalb wurde untersucht, ob die Bindung von WTF die Ausbildung der immunologischen Synapse beeinflusst.

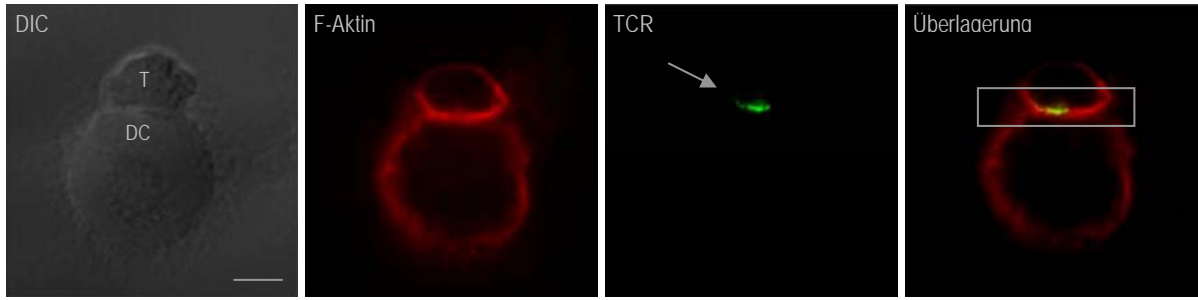


Schema 5.3.: Protokollschema für die Untersuchung von APC/T-Zell-Interaktionen. Dendritische Zellen wurden in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF aus humanen Monozyten generiert, mit LPS ausgereift, mit bakteriellen Superantigen SEA/SEB gepulst und auf Poly-L-Lysin adhärirt. T-Zellen wurden mit WTF inkubiert und den adhärierenden mDC hinzugefügt. Innerhalb von 20-30 min kommt es zur Ausbildung einer reifen immunologischen Synapse (IS), die anschließend mikroskopisch analysiert werden kann.

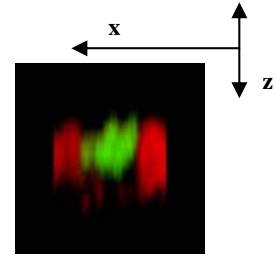
Dafür wurden aus gereinigten humanen Monozyten in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF dendritische Zellen generiert. Die nach 6 Tagen erhaltenen dendritischen Zellen (imDC) wurden für für 1-2 Tage mit LPS ausgereift (**Schema 5.3.**). Obwohl im allogenen System gearbeitet wurde, d.h. DC und T-Zellen von verschiedenen Blutspendern stammten, wurden

die MHC-Moleküle reifer dendritischer Zellen (mDC) mit Superantigenen zu beladen, um eine effiziente Konjugatbildung zu gewährleisten. T-Zellen wurden mit WTF bzw. mock nach dem beschriebenen Protokoll inkubiert und im Verhältnis 1:4 (DC:T) zu den mDC hinzugefügt, die auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern adhären wurden. Nach 20-25 min wurden die Konjugate mit 4 % PFA für die intrazelluläre Färbung fixiert und permeabilisiert und gegen TCR und F-Aktin gefärbt, die anschließend mit dem konfokalen Mikroskop analysiert wurden. **Abb. 5.19.** ist repräsentativ für >100 analysierte DC/T-Zell-Konjugate mock und WTF-behandelter Zellen aus mehreren unabhängigen Experimenten. Die Ligation von T-Zell-Rezeptoren durch MHC-Rezeptoren führt zur Konjugatbildung, die in der Zell-Zell-Kontaktzone eine erhöhte Polymerisierung von F-Aktin aufweist. Der T-Zell-Rezeptor, der in ruhenden T-Zellen gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt ist, wird innerhalb der Kontaktzone zu Clustern konzentriert (Pfeil in **Abb. 5.19.**). Überraschenderweise zeigt der Vergleich der Effizienz der Konjugatbildung von Kontrollzellen mit der Konjugatbildung WTF-behandelter T-Zellen keinen erkennbaren Unterschied. Offensichtlich können MV-exponierte T-Zellen weiterhin Konjugate mit APC ausbilden.

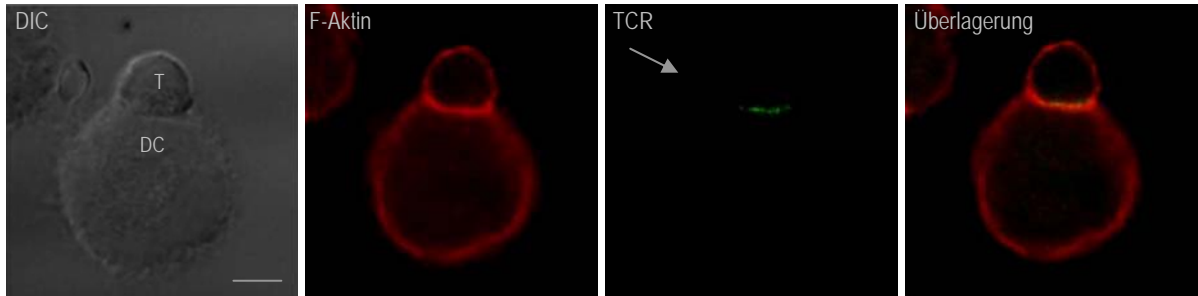
(A) mock



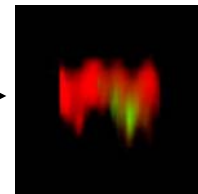
xz-Projektion



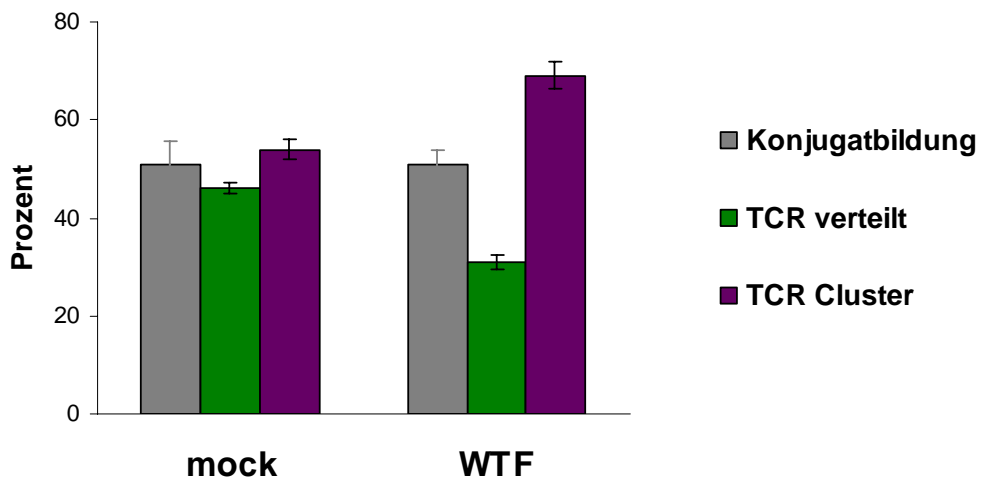
WTF



xz-Projektion



(B)



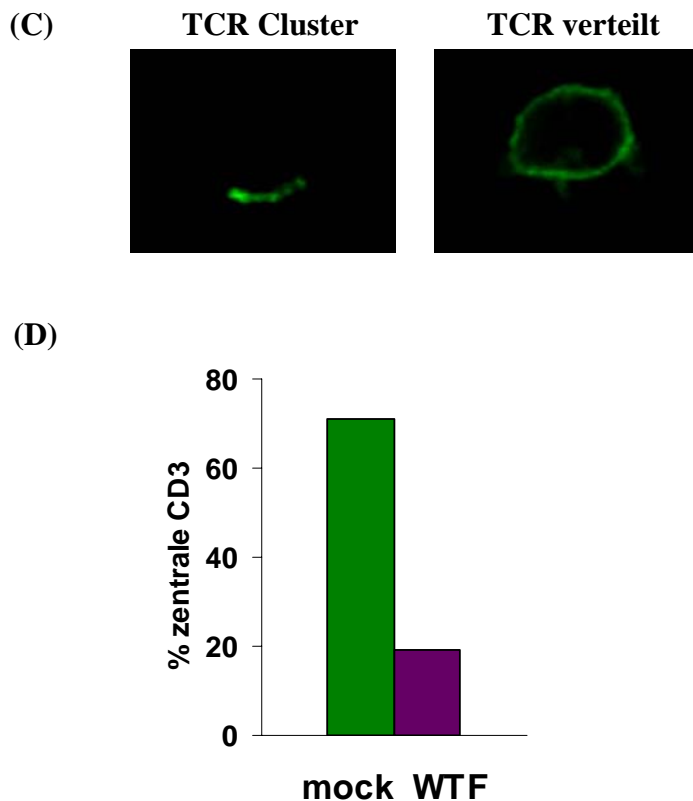


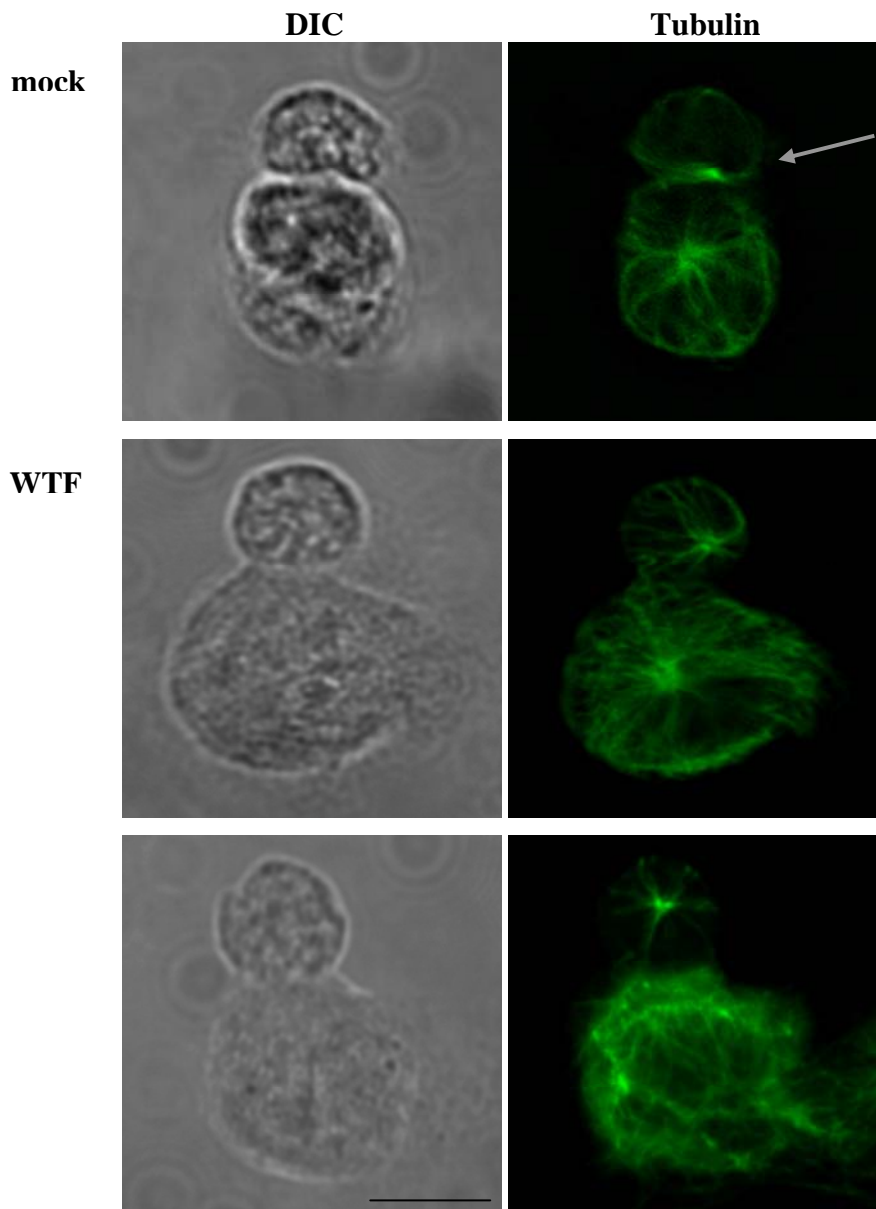
Abb. 5.19.: WTF hat keinen Einfluss auf die Anzahl der Konjugate zwischen T-Zellen und DC verändert aber deutlich die organisierte SMAC Struktur in der zentralen Synapse. (A) Dendritische Zellen wurden mit bakteriellem Superantigen SEA/SEB gepulst, auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger adhärirt, mock- bzw. WTF-behandelte T-Zellen im DC/T-Zell-Verhältnis 1:4 zugefügt, die Interaktion nach 20 min durch Zugabe von 4 % PFA fixiert, permeabilisiert und die Konjugate mit Anti-TCR und Phalloidin-Alexa594 gefärbt. Die repräsentativen Aufnahmen zeigen die mittlere Ebene von fokalen xy-Ebenen, die in der z-Achse aufgenommen wurden. Für die Analyse von SMAC wurden die z-Stapel der zentralen Synapse (graue Markierung in der Überlagerung) 3-dimensional rekonstruiert und um 90°C rotiert, um eine Ansicht der Zone aus der Perspektive der T-Zelle zu erhalten. **(B)** Für die quantitative Auswertung wurden zwischen 100 und 150 Konjugate analysiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Ausgewertet wurde die Anzahl der DC/T-Zell-Konjugaten (grau) und die Anzahl von T-Zellen von Clustern (grün) und verteilten (violett) TCR in den Konjugaten. **(C)** Beispiel für das Muster von den in B ausgewerteten TCR Clustern und verteilten TCR. **(D)** Jeweils 20-25 zentrale Synapsen wurden für die 3D-Rekonstruktion in A analysiert.

Die quantitative Analyse der DC/T-Zell-Kontakte hinsichtlich der Anzahl der Konjugatbildenden T-Zellen und der Verteilung des T-Zell-Rezeptors (**Abb. 5.19. A und B**) wies nur eine geringfügige Veränderung auf. Die Anzahl T-Zellen, die TCR Cluster in der Kontaktzone aufweisen, ist in MV behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen nur um ~ 15 % erniedrigt. In der Anzahl der DC/T-Zell-Kontakte zwischen mock und WTF konnte kein

Unterschied festgestellt werden. Eine Gesamtanzahl von ~50 % DC/T-Zell-Konjugatbildung entspricht den aus der Literatur bekannten Werten. Ein weiteres Maß für die Qualität der DC/T-Zell-Interaktionen ist die Ausbildung 3-dimensionaler Cluster innerhalb der DC/T-Zell-Kontaktzone, den als *supramolecular activation cluster* (SMAC) organisierten Strukturen, die in der reifen Synapse ausgeprägt werden. Um die Ausprägung der SMAC Regionen zu untersuchen wurden von den zentralen Synapse (gelbe Markierung in **Abb. 5.19.A**) 20 fokale xy-Ebenen in 0.5 μ M Abständen entlang der z-Achse aufgenommen. Mit diesen Daten wurde eine 3D-Rekonstruktion der Synapse generiert, die Ansicht um 90° rotiert, wodurch die Aufsicht auf die SMAC Region innerhalb des Zell-Zell-Kontaktes erhalten wird, vergrößert dargestellt in **Abb. 5.19.C**. In der Kontrollfärbung ist F-Aktin als peripherer Ring um das zentrierte TCR Cluster akkumuliert, während die zentrale Synapse in der WTF-behandelten Zelle deutlich verändert ist. In über ~50 % der analysierten Synapsen WTF-behandelter T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor nicht zu einem zentralen Cluster organisiert.

Die Reorientierung des MTOC in Richtung der Synapse in den Kontrollzellen findet effizient statt (**Abb. 5.20.**) und stimmt mit den aus der Literatur bekannten Daten überein (144). Dagegen zeigt der Hauptteil der WTF-behandelten Zellen, dass das MTOC nur teilweise in Richtung der Synapse orientiert ist. Das weist darauf hin, dass MV die Fähigkeit der T-Zellen in Richtung der dendritischen Zellen zu polarisieren und eine funktionelle IS auszubilden, stört.

(A)



(B)

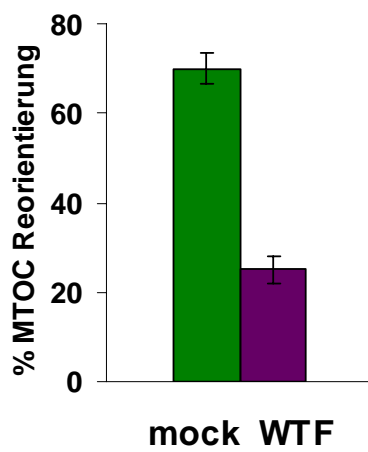
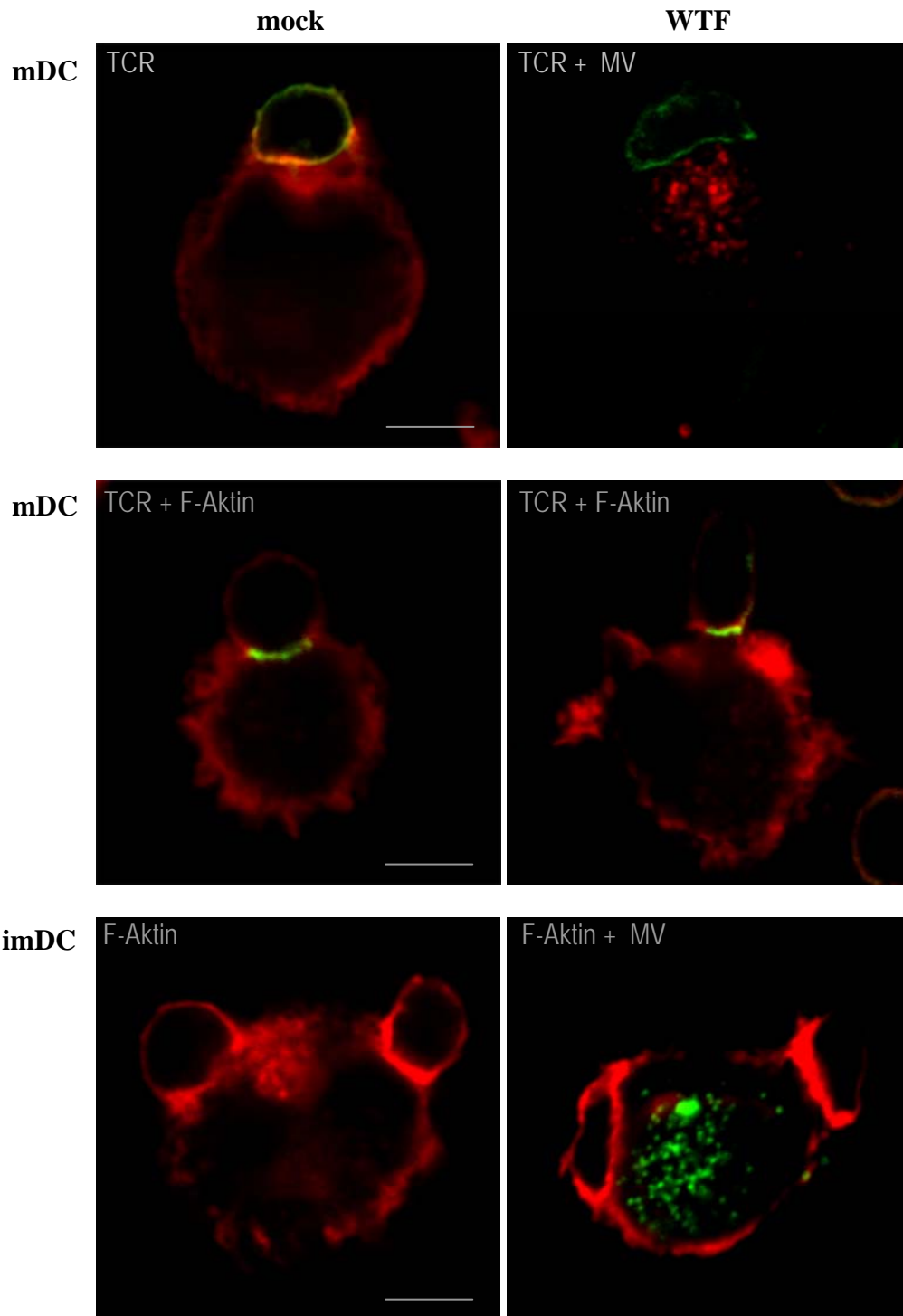


Abb. 5.20.: WTF verhindert eine effiziente Tubulin-Reorientierung der T-Zellen in Richtung DC. (A) Zur Visualisierung von Tubulinstrukturen wurden DC/T-Zell-Konjugate mittels PHEMO-Fix fixiert und anschließend mit einem α -Tubulin Antikörper gefärbt (146). Der Pfeil zeigt die Reorientierung des MTOC zur DC/T-Zell-Kontaktzone. (Maßstab 5 μ m) (B) Für die quantitative Auswertung wurden jeweils etwa 150 Konjugate analysiert.

5.11. Analyse der DC/T-Zell-Konjugatbildung WTF-infizierter MoDCs

Die Infektion unreifer dendritischer Zellen (imDC) mit WTF führt zur Ausreifung der Zellen, welche sich in der Expression typischer „Reifungsmarker“ (z.B. CD49, CD80, CD83, CD86 und MHC) zeigt (75). Um zu untersuchen, wie sich die Infektion auf die Ausbildung der IS auswirkt, wurden unreife DC mit WTF einer MOI von 1 für 24 Stunden infiziert und die DC-T-Zell Kontakte mit mock-behandelten unreifen DC und LPS-ausgereiften DC bezüglich der Konjugatbildung und Verteilung des TCR verglichen (**Abb. 5.21.A und B**). Zur Verhinderung der Zellfusion wurde FIP hinzugefügt. Die Anzahl Konjugat-bildender WTF-infizierter T-Zellen mit unreifen dendritischen Zellen ist erhöht (~70 %) und vergleichbar mit LPS-ausgereiften DCs (~70 %). Dagegen bilden unreife DCs weniger DC/T-Zell-Konjugate. Die WTF-Infektion hat nur wenig Einfluss auf die Ausbildung von TCR-Clustern in der IS. Nach Konjugatbildung von T-Zellen mit mock-behandelten unreifen DCs bilden in circa 15 % der T-Zellen TCR-Cluster aus. In T-Zellen, die mit LPS-ausgereiften DCs konjugieren, bilden sich ~70 % TCR-Cluster. Die Anzahl TCR-Cluster-bildender T-Zellen ist nach Konjugatbildung mit WTF-infizierten DCs leicht erhöht (~20 %). Somit scheint die WTF-induzierte Ausreifung der dendritischen Zellen keinen Einfluß auf die Bildung von TCR-Cluster in der DC/T-Zell-Kontaktzone zu haben.

(A)



(B)

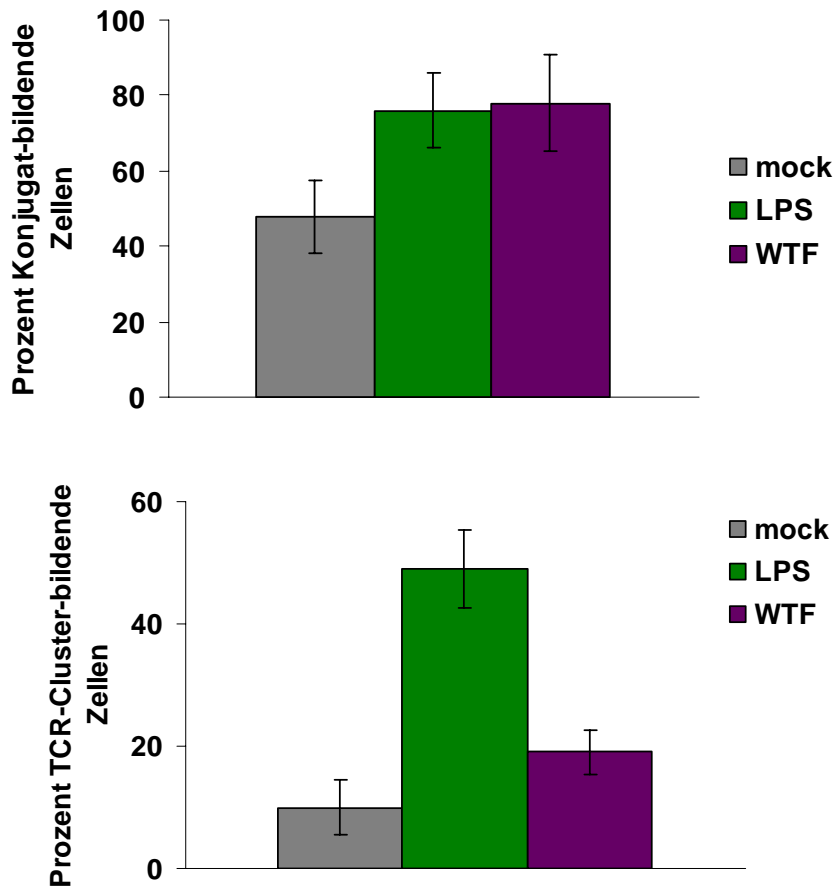


Abb. 5.21.: Konjugatbildung WTF-infizierter dendritischer Zellen mit T-Zellen. (A) Unreife dendritische Zellen (d6) wurden für 24 h mit WTF einer MOI von 1 infiziert. Zur Analyse der Konjugatbildung wurden WTF-infizierte DC, LPS-ausgereifte und imDC auf Poly-L-Lysin adhärirt, mit SEA/SEB gepulst und T-Zellen im Verhältnis 1:4 für 25 min zugefügt. Die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert und mit humanem MV-Serum, Anti-TCR und Phalloidin-Alexa594 gefärbt. (Maßstab 5 µm) (B) Quantitative Analyse von jeweils 150-200 DC/T-Zell-Kontakten.

6. Diskussion

Es ist ein Kennzeichen der MV-induzierten Immunsuppression, dass aus Patienten isolierte periphere mononukleäre Blutzellen nach Mitogengzugabe nicht proliferieren (89). Neben der quantitativen Veränderung zirkulierender Lymphozyten, werden Veränderungen in der Funktion der Lymphozyten während und nach der Infektion mit MV gefunden. Der Kontakt von T-Zellen mit Viruspartikeln oder infizierten Zellen, welche MV H und F auf der Oberfläche exprimieren, inhibiert die Proliferation der Lymphozyten. Primäre T-Zellen können nach Kontakt mit MV Glykoproteinen weder auf mitogene, allogene oder CD3/CD28 induzierte Stimulation proliferieren (90). Der Kontakt mit MV Glykoproteinen mit der Oberfläche von T-Zellen führt zur Inhibition der IL-2 abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase B/Akt (95). Untersuchungen haben gezeigt, dass infolge der Bindung von MV Glykoproteinen an die Oberfläche von T-Zellen, die Rekrutierung der PI3-Kinase zur Zellmembran und deren Aktivierung in TCR-stimulierten Zellen deutlich reduziert ist (95). Die Bindung von MV an Membran-rafts verhindert den Transport der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3-Kinase, indem die CD3/CD28 stimulierte Degradierung des Negativ-Regulators Cbl-b inhibiert wird und nachfolgend die Aktivierung der PI3-Kinase und davon abhängiger Signalkomponenten. Damit verbunden ist eine ineffiziente Akkumulation der PH-Domänen-enthaltenden Proteine Vav und Akt-Kinase in Membran-rafts (95).

Aktives Vav induziert die Aktivierung der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1, welche eine kritische Rolle in der Regulation des Zytoskelettes von T-Lymphozyten spielen (97). Da alle Stadien in der Aktivierung von Lymphozyten mit Veränderungen der Zellmorphologie (Migration, Adhäsion, Bildung der IS) assoziiert sind und von einem funktionellen Zytoskelett abhängen, wurde in vorliegender Arbeit untersucht, inwieweit der Kontakt von MV Glykoproteinen mit der Oberfläche primärer T-Zellen sowohl die Reorganisation als auch wichtige Komponenten der Zytoskelettaktivierung beeinflusst. Daher wurden T-Zellen mit MV inkubiert und anschließend der Einfluß auf CD3/CD28 stimulierte Zytoskelettveränderungen untersucht. Durch die Inkubation von T-Zellen mit MV bei 4°C wird eine gleichmäßige Virusbindung an die Zelloberfläche und ein separates Signal ermöglicht. Durch Untersuchungen *in vitro* wurde belegt, dass der Kontakt MV-infizierter DC-Zellen mit T-Zellen eine Proliferationsinhibition induziert (80). Dies lässt vermuten, dass *in vivo* die

Proliferationsinhibition neben anderen Faktoren durch Kontakt MV-infizierter DCs mit T-Zellen vermittelt wird. Die MV-induzierte Proliferationsinhibition hängt allerdings von einer Vielzahl von Faktoren ab, z.B. dem Reifungsgrad der DCs, welcher durch die MV-Infektion beeinflusst wird und eine veränderte Expression von Oberflächenmolekülen, die in die Interaktion mit T-Zellen involviert sind. Die Inkubation von T-Zellen mit einer gereinigten MV-Präparation bietet den Vorteil, dass hierbei nur durch MV Glykoproteine induzierte Signale untersucht werden können und diese damit unabhängig von anderen Faktoren sind. Die durch die Bindung von MV Glykoproteinen an die T-Zellmembran induzierten inhibitorischen Signale lassen sich direkt auf eine Interferenz der viralen Glykoproteine mit der für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wichtigen Signale zurückführen.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Kontakt mit MV zur reduzierten Aktivierung von F-Aktin, dem Hauptbestandteil des Zytoskeletts führt (**Abb. 5.4.**). Die Aktivierung des Zytoskeletts ist abhängig von der Phosphorylierung durch Tyrosinkinase (97). Frühere Untersuchungen zeigten, dass ein kurzzeitiger Kontakt mit MV Glykoproteinen keinen Einfluss auf die Gesamt-Tyrosin-Phosphorylierung der T-Zellen hat (96). Erst 24 Stunden nach dem MV-Kontakt ist die Phosphorylierung an Tyrosinresten inhibiert. Daher kann durch kurzzeitigen MV-Kontakt induzierte reduzierte Aktivierung des F-Aktins nicht durch die Hemmung der Gesamt-Tyrosin-Phosphorylierung verursacht werden. Die Aufnahmen in **Abb. 5.6.** zeigen, dass die CD3/CD28 Costimulation in mock-behandelten Zellen die Polymerisierung von F-Aktin aktiviert und die Ausbildung ausgedehnter Lamellipodien- und Filopodienstrukturen induziert. Dagegen weisen MV-behandelte T-Zellen unzureichend aktiviertes F-Aktin auf. Die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien ist drastisch verändert. Anhand rasterelektronenmikroskopischer Analysen (**Abb. 5.15.**) wurde gezeigt, dass infolge des MV-Kontaktes die CD3/CD28 induzierte Lamellipodienausbildung teilweise erfolgt und deren Struktur großflächige Unterbrechungen aufweist. Von Bedeutung ist, dass die Organisation von Zytoskelettstrukturen in verschiedenen Kompartimenten einer Zelle, z.B. die polarisierte Struktur einer motilen T-Zelle, mit führender Front, Hauptkörper und distalem Uropod, unterschiedlich sein kann (135). Da viele Signalmoleküle mit dem Zytoskelett assoziiert sind, bereitet das Zytoskelett eine Umgebung, in welcher Proteine binden können. Daher können selbst subzelluläre Unterschiede im Aktin-Zytoskelett zu profunden funktionellen Konsequenzen führen. Somit könnte bereits eine lokale Bindung von MV zu Veränderungen in der F-Aktin Aktivierung führen und damit die Proliferation

beeinflussen. **Abb. 5.7.** zeigen, dass die lokale MV-Bindung die Ausbildung von Lamellipodien verhindert. Vermutlich sind neben den mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesenen MV-Clustern auch kleinere Aggregate an die T-Zell-Oberfläche gebunden, die aber mit der angewandten Methode nicht darstellbar sind. Bei den verwendeten Virus-suspensionen liegt das Virus mehrheitlich nicht als Einzelpartikel, sondern in Form von Aggregaten vor.

Kürzlich wurde demonstriert, dass das Molekül CD46, welches als Rezeptor von MV Vakzinestämmen genutzt wird, *in vitro* durch Antikörper-induzierte CD46/CD3 Ligation in primären T-Zellen ebenfalls eine Aktivierung von F-Aktin induzieren kann (150). Allerdings ist die Aktivierung von einer Costimulation abhängig, da CD46 selbst keinen Effekt auf das Zytoskelett verursacht. Durch CD46/CD3 Coligation wird Vav an Tyrosin phosphoryliert und dies resultiert in F-Aktin-Reorganisation und in drastischen morphologischen Veränderungen (150). Die physiologische Bedeutung der CD46/CD3 Costimulation *in vivo* ist noch unklar. Da MV Wildtypstämme nicht oder wenig effizient mit CD46 interagieren, ist es nicht wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit beschriebenen morphologischen Veränderungen von einer CD46 Ligation abhängig sind (61). Desweiteren ist das CD46-Molekül gleichmäßig auf der T-Zellmembran verteilt und nicht in Membran-rafts lokalisiert (95). Dagegen sind die MV Proteine nach der Bindung an die T-Zell-Membran vor allem in den Membran-raft-enthaltenen Bereichen zu finden (96). Die GTP-Beladung von Cdc42 und Rac1 war in MV-behandelten Zellen nach CD3/CD28 Stimulation reduziert. Durch Antikörper-induzierte Ligation von CD46/CD3 wurde allerdings nur die GTPase Rac1 aktiviert, aber nicht die GTPasen RhoA und Cdc42 (150). Dagegen war in WTF-behandelten T-Zellen eine leichte Erhöhung der RhoA Aktivität zu beobachten (**Abb. 5.5.**).

Aus der Literatur ist bekannt, dass das F-Protein von RSV (Respiratorisches Syncytialvirus) in Lungenepithelzellen mit RhoA interagiert und dieses aktiviert (155). RSV, kann, wie andere Vertreter der Morbilliviren, z.B. CDV (Canine Distemper Virus), RPV (Rinderpestvirus) und PPRV (Pestes-des-petits ruminants virus), *in vivo* eine Immunsuppression induzieren (156). Die Interaktion von RSV mit RhoA verstärkt die Virus-induzierte Synzytienbildung. Die Aminosäuren 67-110 von RhoA binden an die Aminosäuren 146-155 des RSV Fusionsproteins. Durch Verwendung eines Peptides, das die Aminosäuresequenz aus der RSV F-bindenden Domäne enthält, konnte *in vitro* die Zellfusion inhibiert werden und

dies führte in RSV-infizierten Mäusen zur Erniedrigung des Virustiters (150). Diese Interaktion zwischen RSV F und RhoA zeigte erstmalig, dass RhoA in die Virus-induzierte Membran-fusion und Synzytiabildung involviert ist. Übereinstimmend mit der RhoA Aktivierung konnte die Stressfaser-Bildung in RSV-infizierten Zellen durch Einsatz des Inhibitors C3 Exotoxin, welches die Effektorfunktion von RhoA inhibiert, die Formation von Stressfasern verhindert werden (157). Ob der Effekt von RhoA in der Virus-induzierten Membranfusion direkt oder eher indirekt ist, z.B. durch Vermittlung von Signalwegen, welche Zytoskelett, Zellform und Bewegung regulieren, ist nicht bekannt. Die T-Zell-Behandlung mit MV induziert nur eine leichte Erhöhung der GTP-Beladung von RhoA. Des Weiteren lassen sich in den MV-behandelten T-Zellen keine Stressfasern nachweisen, wie diese durch die RSV-Infektion induziert werden (157). Die Bedeutung der MV-induzierten RhoA Aktivierung für die Zytoskelettdynamik bleibt zu klären.

Die MV-induzierte Proliferationsinhibition erfordert keine virale Membranfusion, hängt aber von der proteolytischen Spaltung des MV F Proteins ab (25,91). Dabei ist für die Induktion der Inhibition der T-Zell-Proliferation die Co-Expression von MV H und F erforderlich. Durch Austausch der MV Glykoproteine gegen das VSV G Protein wurde keine Proliferationsinhibition induziert (90). Desweiteren zeigten Untersuchungen an CD46 und CD150 negativen Zelllinien und durch Blockierung der Rezeptoren mit Antikörpern, dass weder CD46 noch CD150 für die proliferative Inhibition notwendig sind (48). Es wurde beschrieben, dass MV mit Membran-rafts interagiert und dadurch die Rekrutierung wichtiger TCR-abhängiger PH-Domänen-enthaltender Signalmoleküle zur Membran, wie Akt und Vav, verhindert (96). Ob diese Interaktion auf einen direkten Kontakt mit den MV Glykoproteinen, z.B. dem proteolytisch aktiviertem F_{1/2} Heterodimer, oder einem noch nicht identifizierten Molekül innerhalb der raft-Bereiche der T-Zellmembran handelt, ist nicht bekannt. Der Tropismus von MV Wildtypviren für Zellen, die kein SLAM exprimieren, wie epitheliale, endotheliale und neuronale Zellen (Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten), deuten auf einen weiteren Rezeptor hin (28, 62-65). Der MV Rezeptor SLAM ist auf Thymozyten, Gedächtniszellen, aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und DCs exprimiert, aber nicht auf den in dieser Arbeit verwendeten ruhenden T-Zellen (96). Daher können die in dieser Arbeit gezeigten Effekte nicht auf eine Interaktion von WTF mit SLAM beruhen. Das Molekül wird nach Aktivierung ruhender T-Zellen induziert und kann durch Ligation mit SLAM-Antikörpern die Proliferation von T- und B-Zellen stimulieren (158). Es wurde

gezeigt, dass SLAM nach CD3 Ligation mit dem T-Zell-Rezeptor in primären humanen T-Zellen colokalisiert und die zytoplasmatische Domäne durch die Kinasen Lck und Fyn Tyrosin-phosphoryliert wird (55). Aufgrund der Signal-übertragenden Eigenschaften von SLAM könnte die Bindung von MV Partikeln oder Glykoproteinen an das Rezeptormolekül die Aktivierung von T- und B-Zellen verändern. SLAM ist an der Regulation der Balance zwischen Th1 und Th2 Immunantwort beteiligt (82). Da Th1 Zellen eine deutlich höhere Expression an SLAM aufweisen, als Th2 Zellen, ist es möglich, dass Th1-Zellen bevorzugt durch MV infiziert werden. Die Herunterregulation von SLAM während der MV Infektion könnte daher die Th1 hin zur Th2 Antwort verschieben (84). Allerdings wurde gezeigt, dass die MV induzierte Proliferationsinhibition unabhängig von SLAM ist (96). Somit könnte die MV induzierte Herunterregulation von SLAM zu einer verlängerten Th2 Antwort beitragen, wenn ausreichend MV infizierte Zellen oder MV Glykoproteine produziert wurden, um eine signifikante Anzahl von Lymphozyten zu kontaktieren (158).

Erste Untersuchungen zwischen zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen zeigten, dass SLAM innerhalb des SMAC-Bereiches der IS lokalisiert ist (159). CD150 ist in der Plasmamembran lateral mobil und bildete in der Kontaktzone zwischen zwei mit eGFP-CD150 transfizierten Jurkat-Zellen Clusterstrukturen. Da CD150 in intrazellulären Kontaktzonen segregiert, könnte eine Funktion von CD150 darin bestehen, die Affinität von, z.B. CD150⁺ Gedächtnis-T-Zellen, mit APCs zu verstärken. MV infizierte DCs können allogene T-Zellen nicht mehr stimulieren bzw. inhibieren deren Proliferation (59,90). Interessanterweise exprimieren ruhende T-Zellen, mit denen infizierte DCs im Lymphknoten konjugieren, kein SLAM. Während der Infektion unreifer dendritischer Zellen mit WTF kommt es zur Expression typischer „Reifungsmarker“ (72,75,80). Kürzlich wurde gezeigt, dass während der Ausreifung von humanen DCs das β 2-Integrin bindende Protein CYTIP (*cytohesin-interacting protein*) exprimiert wird, welches die De-Adhärenz der T-Zellen von der DC-Oberfläche vermittelt (160). CYTIP akkumuliert während der initialen DC/T-Zell-Kontakte in der Interaktionszone und scheint spezifisch DC/T-Zell-Kontakte zu regulieren, da die Bindung von DCs an endothelialen Zellen nicht durch eine Inhibition von CYTIP beeinflusst wird. Das De-adhärenz der T-Zellen von DCs ist notwendig, damit T-Zellen nach Antigen-Erkennung klonal expandieren und die lymphatischen Organe verlassen können oder weitere DCs nach relevanten Antigen scannen können. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die WTF-induzierte Reifung der DCs die Expression von CYTIP supprimiert und dadurch die De-

Adhärenz der interagierenden T-Zellen von der DC und somit ein Scannen der DCs durch T-Zellen verhindert.

Während der Aktivierung von T-Zellen wird das F-Aktin polymerisiert und reorganisiert, um morphologische Veränderungen, Migration und die Formation der immunologischen Synapse zu ermöglichen (97,101,102,106). Die Regulation der Adhäsion humaner T-Zellen ist von essentieller Bedeutung für die Immunantwort. Zirkulierende Lymphozyten adhären an Komponenten der Extrazellulärmatrix an Stellen der Inflammation und in lymphoiden Geweben (135,136). Für die Zellmotilität ist Aktin-Dynamik, Veränderung der Integrin-vermittelten Adhärenz und Modifikation in der Zellform erforderlich (101,102). Es wurde gezeigt, dass Rho GTPasen wichtige Regulatoren der Polarisierung und Migration von T-Zellen sind (161). Um zu demonstrieren, dass der Kontakt mit MV-infizierten Zellen zu morphologischen oder funktionellen Änderungen von T-Zellen führt, wurde die Migration von T-Zellen auf ED-infizierten U251p-Zellen untersucht, da diese Zellen zu 100% virale Glykoproteine auf der Oberfläche exprimieren. Die Analyse der Migration eGFP-Aktin-transfizierter T-Zellen auf der ED-infizierten Zelllinie zeigte, dass die Migrationsgeschwindigkeit der T-Zellen deutlich verringert wurde (**Abb. 5.11.,12**). Die T-Zellen bildeten nach Kontakt mit nicht-infizierten U251-Zellen Uropodien aus, welche nach Kontakt mit ED-infizierten Zellen fehlten (**Abb. 5.11.**). Ähnlich zeigen MV-behandelte T-Zellen nach Integrin-Aktivierung auf Fibronectin, einem Bestandteil der Extrazellulärmatrix, eine nur teilweise polarisierte Struktur (**Abb. 5.9.**). Eine mögliche Ursache der MV Glykoprotein-induzierten Inhibition der Polarisierung können die nicht aktivierten GTPasen Cdc42 und Rac1 bzw. die reduzierte F-Aktin Aktivierung sein (**Abb. 5.5.**). Da zur Verhinderung der viralen Membranfusion ein Fusionsinhibitor hinzugefügt wurde, kann die verringerte Migrationsgeschwindigkeit nicht durch virale Membranfusion mit der T-Zell-Membran hervorgerufen werden. Die MV Rezeptoren CD46 und CD150 werden auf persistierend-infizierten Zellen herunterreguliert, die MV-Glykoproteinen könnten aber mit CD46 auf der Oberfläche der kontaktierenden T-Zellen binden, und durch ein Arretieren der T-Zellen die verlangsamte Migrationsgeschwindigkeit bewirken. Eine persistierend WTF-infizierte Zelllinie, welche die Interaktion mit CD46 umgehen würde, steht momentan nicht zur Verfügung.

Während der Interaktion von Leukozyten mit endothelialen Zellen sind Mikrovilli involviert, spezialisierte periphere Strukturen auf der Oberfläche vieler Zelltypen, die bei Adhäsions-

vorgängen von Lymphozyten eine kritische Rolle spielen (162,163). Die Behandlung von T-Zellen mit MV führt zur kompletten Eliminierung von Mikrovilli auf der Oberfläche WTF-behandelter T-Zellen (**Abb. 5.15.**). Sowohl der Verlust an Mikrovilli als auch die inhibierte F-Aktin-Polymerisation MV-behandelter T-Zellen könnte die T-Zell-Migration an Endothelzellen reduzieren. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Behandlung von T-Zellen mit Cytochalasin B oder D, zwei Toxinen, welche die Aktinpolymerisation inhibieren, signifikant das Rollen von T-Zellen entlang des Endothels verhinderte (164,165). Die Regulation von Mikrovilli wird durch ERM-Proteine und Rho GTPasen vermittelt. Colokalisationsanalysen zeigen, dass die wenig ausgebildeten radialen Lamellipodien- und Filopodien-Strukturen in MV-behandelten Zellen mit einer reduzierten ERM-Phosphorylierung und reduzierten F-actin Polymerisierung einhergehen (**Abb. 5.13.,14.**). Übereinstimmend mit der Literatur sind die ERM-Proteinen in mock-behandelten nicht-stimulierten T-Zellen phosphoryliert (166) (**Abb. 5.13.,14.**). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass nicht-stimulierte und CD3/CD28 costimulierte WTF-behandelte T-Zellen keinerlei Mikrovilli-Strukturen auf der Oberfläche tragen. Das ist übereinstimmend mit Daten anderer Untersuchungen, die zeigten, dass die Ausbildung von Mikrovilli von phosphorylierten ERM-Proteinen abhängig ist (167). Der komplette Verlust von Mikrovilli ist ähnlich der Morphologie primärer humaner T-Zellen, die durch Latrunculin A (Inhibitor, der die Aktin-Polymerisierung blockiert) oder durch ERM *knock-out* induziert werden kann (167,168). Da WTF mit Rho GTPasen, welche sowohl die ERM-Phosphorylierung als auch die Mikrovillibildung regulieren können, interferiert, könnte die Inhibition der GTPasen Cdc42 und Rac1 zur Dephosphorylierung der ERM-Proteine führen und damit zum Verlust von Mikrovilli. Wenig ist allerdings bekannt, wie die ERM-Phosphorylierung durch Rho GTPasen in CD3/CD28 costimulierten Zellen reguliert wird und welche Auswirkungen das auf die Ausbildung von Mikrovilli hat. Untersuchungen zeigten, dass die ERM-Phosphorylierung bzw. -Dephosphorylierung von externen Stimuli abhängig ist (z.B. Chemokin-induzierter Polarisierung oder APC/T-Zell-Kontakten) (129). Eine Stimulation von Leukozyten mit SDF1- α induziert die ERM-Dephosphorylierung, währenddessen infolge Thrombinaktivierung in Thrombozyten die Phosphorylierung dominiert (166,169). Eingehende Studien wurden an mit dem Chemokin SDF-1 α stimulierten primären T-Zellen durchgeführt (152,166). Infolge des SDF-1 α Stimulus kommt es zu einer rapiden Dephosphorylierung der ERM-Proteine und zum Zusammenbruch von Mikrovilli-Strukturen. Die SDF-1 α induzierte Eliminierung von Mikrovilli erhöht möglicherweise den Kontakt von Integrinen und Transmembranrezeptoren auf Lymphozyten mit den Liganden

auf dem Endothel während der Leukozytenpolarisierung und könnte dadurch eine starke Adhäsion der T-Zellen mit Endothelzellen unterstützen (170,171). Da die Transmigration durch Endothelzellen eine extreme Deformation von Lymphozyten erfordert, könnte die Persistenz von Mikrovilli möglicherweise auch ein Hindernis für die transendotheliale Migration darstellen (129,166). Kürzlich wurde demonstriert, dass ERM-Proteine nach TCR-abhängiger Antigenerkennung rapide dephosphoryliert werden, was eine Entspannung des Zytoskeletts zur Folge hat und damit APC/T-Zell-Konjugatformation fördert (153). Das ‚Entakern‘ des Aktin-Zytoskeletts von der T-Zell-Membran erniedrigt die Membranstarrheit und ermöglicht dadurch eine effizientere Konjugatbildung. Dieser Mechanismus ist in dem in der Literatur verwendeten System von einem Vav-Rac1-Signalweg abhängig. In MV-behandelten T-Zellen ist sowohl der Transport von Vav in Membran-rafts als auch die Aktivierung von Rac1 blockiert (**Abb. 5.3.,5.5**). Während der APC/T-Zell-Interaktion entwickeln T-Zellen ausgedehnte Lamellipodien, die sich entlang der APC-Oberfläche ausdehnen (172,173). Sowohl Cdc42 als auch Rac1 induzieren ausgedehnte Lamellipodien- und Filopodien-Strukturen und Membran-*ruffles* (174,175). Damit übereinstimmend entwickeln mock-behandelte Kontrollzellen nach CD3/CD28 Costimulation ausgeprägte Lamellipodien-Strukturen. Dagegen können MV-behandelte T-Zellen nach CD3/CD28 Ligation diese Aktin-assoziierten Membranstrukturen nicht mehr bilden (**Abb. 5.15.B**). Das ist übereinstimmend mit der beobachteten MV-induzierten Inaktivierung von Cdc42 und Rac1 (**Abb. 5.5.A**) und inhibierten Aktin-Polymerisierung. Interessanterweise können T-Zellen nach Bindung von MV trotz der in dieser Arbeit beschriebenen drastischen Effekte auf Membran-Zytoskelett-Interaktionen weiterhin Konjugate mit LPS-ausgereiften DCs bilden (**Abb. 5.19. A,B**). Allerdings ist die Akkumulation des TCR innerhalb der immunologischen Synapse WTF-behandelter T-Zellen gestört. Interessanterweise ist die nicht-zentrale Akkumulation des TCR mit T-Zell-Anergie in Verbindung gebracht worden (116,176). Die dabei dokumentierte IS Bildung ist mit den in dieser Arbeit gezeigten Verteilungsmustern vergleichbar. Der Aktin-abhängige Transport von TCR-Komplexen in die Membran-raft Bereiche und Clusterbildung von Rezeptoren sind Strategien von T-Zellen, um höher geordnete Strukturen von Rezeptorclustern zu ermöglichen, in welchen Signalmoleküle und Adaptorproteine konzentriert und Negativregulatoren ausgeschlossen werden, was zu effektiven TCR Signalen und zur Lymphozytenaktivierung führt. Es sind verschiedene Morphologien und molekulare Organisationen immunologischer Synapsen bekannt – monozentrische (reife), sekretorische,

multizentrische, nicht-segregierte und dynamische immunologische Synapsen (126,127,177). Eine stabile, monozentrische IS resultiert aus der polarisierten Interaktion der T-Zellen mit der APC, bei der sich zentrale Cluster von TCR-, Adhäsions- und Signalmolekülen in der APC/T-Zell-Kontaktzone bilden (SMAC). Bei denen in dieser Arbeit analysierten Synapsen handelt es sich um monozentrische, reife Synapsen.

Während der TCR-Antigen-Erkennung kommt es zur Polarisierung der T-Zelle in Richtung der interagierenden Zielzelle. Die damit verbundenen dramatischen Zytoskelettlagerungen sind auch mit der Reorientierung des Tubulin-Zytoskelettes verbunden (MTOC) (144,145). MV-behandelte T-Zellen zeigten dagegen eine nur unvollständige MTOC-Translokation (**Abb. 5.20.**). Das stimmt mit den Beobachtungen überein, dass MV die Fibronectin- bzw. CD3/CD28 Antikörper-induzierte Polarisierung inhibiert (**Abb. 5.9.**). Vermutlich kann das durch die MV-induzierte Interferenz der Aktivierung von Rho GTPasen verursacht werden, da Rho GTPasen, vor allem Cdc42, bei der Dynamik von Tubulin-Strukturen und der MTOC-Relokalisation eine wichtige Rolle spielen (136,144).

Eine Verbindung zwischen T-Zell-Costimulation und Reaktivierung des Aktin-Zytoskeletts ist Cofilin, ein Protein, das zur Familie der kleinen Actin-bindenden Proteine gehört (101). Cofilin bindet sowohl globuläres als auch filamentöses Aktin und induziert Aktin-Depolymerisierung. Übereinstimmend mit der Literatur ist Cofilin in nicht-stimulierten mock-behandelten T-Zellen phosphoryliert (**Abb.5.17., 5.18.**) (111). Phosphoryliertes Cofilin bindet nicht an F-Aktin und dies resultiert in einer Stabilisierung des F-Aktins. Die Dephosphorylierung von Cofilin ermöglicht die Bindung an F-Aktin und vermittelt die Depolymerisierung und Trennung polymerisierter F-Aktin-Fasern (101,178). Somit kann eine Aktivierung von Cofilin nicht nur die Dynamik von F-Aktin-Umlagerungen regulieren und damit Prozesse unterstützen, die ein flexibles Zytoskelett erfordern, wie T-Zell-Migration, sondern auch zum Abbau polymeriserten F-Aktins führen. Gemäß Literatur wird Cofilin in T-Zellen durch CD2 oder CD3/CD28 Costimulation aktiviert (111). Damit übereinstimmend wird Cofilin in mock-behandelter T-Zellen in Verlauf der CD3/CD28 Costimulation dephosphoryliert. Interessanterweise zeigen allerdings die durchgeführten Untersuchungen CD3/CD28 costimulierter MV-kontakterter Zellen, dass Cofilin signifikant dephosphoryliert und damit aktiviert wird (**Abb. 5.17.**). Dies wird bestätigt durch mikroskopische Analysen MV-behandelter CD3/CD28 costimulierter T-Zellen. In MV-behandelten T-Zellen mit unvollständiger F-Aktin-Polymerisierung und nicht-ausgebildeten Lamellipodien ist Cofilin stark dephosphoryliert (**Abb. 5.18.**). Da die Bindung von MV im Zeitverlauf der

Costimulation eine starke Dephosphorylierung sowohl der ERM-Proteine und als auch von Cofilin bewirkt, ist zu vermuten, dass durch die MV-induzierten Signale Kinasen bzw. Phosphatasen aktiviert werden. Verschiedene Kinasen wurden identifiziert, wie ROCK, PKC θ , LIMK, TESK und Pak1, deren Substrat Cofilin ist (107-110,173). Rho GTPasen können durch die Kinasen ROCK (Rho GTPase Effektor-Rho-Kinase) und Pak1 (p21-aktivierte Kinase) die LIM-Kinase phosphorylieren, welche Cofilin phosphoryliert und inaktiviert (179). Die Tes-Kinase wird durch Stimulation von Integrinen aktiviert, welche Rho aber nicht ROCK oder Pak1 erfordern (180). Weniger bekannt sind die Phosphatasen, welche die De-phosphorylierung von Cofilin regulieren können. Die Phosphatasen PP1/PP2A und PP2B können Cofilin in T-Zellen infolge der CD3/CD28 Costimulation dephosphorylieren (111). Allerdings wurde beschrieben, dass Cofilin auch in Zellen dephosphoryliert werden kann, in denen die Phosphatasen PP1/PP2A inaktiviert sind (180), was vermuten lässt, dass noch weitere bisher unbekannte Phosphatasen involviert sind. Eine weitere Phosphatase SSH (*slingshot*) kann ebenfalls Cofilin-vermittelte Aktinumlagerungen regulieren (112,181). Interessanterweise kann Cofilin durch SSH über einen PI3K-abhängigen Signalweg dephosphoryliert werden (112). Sowohl die Dephosphorylierung von Cofilin als auch die Assoziation mit F-Aktin konnte durch Einsatz eines PI3K-Inhibitors (wortmannin) blockiert werden (112). Da die PI3K-Aktivierung zur Phosphorylierung von SSH führt, welche Cofilin dephosphoryliert, könnte die MV-induzierte Hemmung der PI3K zur Inaktivierung von SSH führen und damit die Dephosphorylierung von Cofilin verhindern. Da aber Cofilin infolge der MV-Bindung deutlich dephosphoryliert ist, wird vermutlich die MV-induzierte Dephosphorylierung durch eine andere Phosphatase verursacht. Allerdings konnte eine Regulation von Cofilin durch PI3K nur für die Insulin-stimulierte Phosphatase-Aktivierung von SSH demonstriert werden. *In vitro* induziert Insulin die PI3K-abhängige Dephosphorylierung und Akkumulation von Cofilin in Membranausdehnungen von Fibroblasten der Maus (112). Der regulatorische Mechanismus, wie PI3K die Dynamik von Aktin-Filamenten und Membranausdehnungen reguliert, ist noch nicht bekannt. Kürzlich wurde gezeigt, dass die SSH-vermittelte Regulation von Cofilin bei der Chemotaxis von Jurkat-T-Zellen eine kritische Rolle spielt (178). Dabei bleiben nach Inhibition von Cofilin und SSH in SDF1 α -stimulierten Jurkat-T-Zellen Lamellipodien erhalten. Vermutlich ist die SSH-vermittelte Regulation der Cofilin-Phosphorylierung für die Chemokin-induzierte Lamellipodien-Bildung und gerichtete Zellbewegung verantwortlich. Erst kürzlich wurde eine

Phosphatase identifiziert, Chronophin, welche eine hohe Spezifität gegenüber P-Cofilin besitzt (182,183). Sowohl SSH als auch Chronophin sind in F-actin reiche Lamellipodien und Membranausdehnungen lokalisiert und weitverbreitet in Hirn, Thymus, Milz, Herz, Leber und Muskel (184). Da aber die Substratspezifität der Kinasen/Phosphatasen nicht vollständig geklärt sind, können die involvierten Enzyme in vorliegender Arbeit nicht identifiziert werden. Allerdings gibt es derzeit keine Hinweise, ob SSH oder Chronophin in primären T-Zellen exprimiert werden. Daher bleibt zu klären, welche Phosphatase für die MV-induzierte Cofilin-Dephosphorylierung in T-Zellen verantwortlich ist.

Obwohl in MV infizierten Patienten auch eine Immunantwort induziert wird, führt die ausgeprägte Immunsuppression häufig zu mikrobiellen, viralen und parasitären Sekundärinfektionen (7,8). Die durch MV induzierte Immunsuppression hat zur Folge, dass eine Reihe von immunologischen Funktionen inhibiert sind. Dazu gehört die MV-Interaktion mit SLAM, die für MV charakteristische Verschiebung einer Th1 zu einer Th2 Antwort, die Modulation von T- und B-Zell-Antworten, die Verschiebung der Zytokinsekretion, eine Veränderung in der Reifung von dendritischen Zellen und die Inhibition der T-Zell-Proliferation (70-72,78,80). MV kann in peripheren Blutlymphozyten in sehr geringer Anzahl während der akuten Phase nachgewiesen werden (ca. 3-5 %, 185). Die Immunsuppression kann klinisch und anhand funktioneller Parameter aber bis zu 2-3 Monate nachgewiesen werden (186). Somit ist es wahrscheinlich, dass die MV induzierte Immunsuppression nicht nur durch die direkte virale Replikation in hämatopoetischen Zellen, sondern auch durch indirekte immunpathogene Mechanismen verursacht wird. Damit übereinstimmend wurde in vorliegender Arbeit demonstriert, dass *in vitro* alleine die Bindung von MV an T-Zellen ausreichend ist, um mit der TCR-stimulierten Aktivierung von F-Aktin und davon abhängigen Prozessen der T-Zell-Aktivierung und Zytoskelettdynamik, wie Polarisierung, Migration und DC/T-Zell-Interaktion zu interferieren. Da die Zytoskelettaktivierung von essentieller Bedeutung für physiologische T-Zell-Antworten ist und alle Stadien der Aktivierung von Lymphozyten mit tiefen Veränderungen in Migration, Adhäsion und APC/T-Zell-Interaktionen assoziiert sind, könnte eine Interferenz von MV mit diesen Signalen die Funktionalität von T-Zellen inhibieren. Da der Kontakt mit dem MV Glykoproteinkomplex somit essentielle Schritte in der APC/T-Zell-Aktivierung supprimiert, könnte dies möglicherweise zur erhöhten Empfänglichkeit von MV-infizierten Patienten gegenüber Sekundärinfektionen beitragen.

7. Zusammenfassung

Der Kontakt humaner T-Zellen mit dem MV Glykoproteinkomplex interferiert mit der CD3/CD28 stimulierten Aktivierung von PI3/Akt-Kinase Signalwegen. Damit verbunden ist der ineffiziente Transport PH-Domänen-enthaltender Proteine in Membran-rafts, wie der Akt-Kinase und Vav, den Guaninnukleotid-Austauschfaktor von Rho GTPasen. Es konnte gezeigt werden, dass infolge des MV-Kontaktes die CD3/CD28 stimulierte Aktivität der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 inhibiert ist. Dagegen war in MV-behandelten Zellen eine leichte RhoA Aktivierung festzustellen. Rho GTPasen spielen eine kritische Rolle in der Regulation von Zytoskelettorganisation von T-Lymphozyten. Übereinstimmend damit wurde gezeigt, dass der Kontakt mit MV die CD3/CD28 costimulierte Aktivierung und Polymerisation des F-Aktins inhibiert. Damit verbunden ist die reduzierte Fähigkeit MV-behandelter T-Zellen auf Fibronectin- und mit CD3/CD28 Antikörpern-beschichteten Objektträgern zu polarisieren. Die Ausbildung F-Aktin-getriebener morphologischer Veränderungen, wie Filopodien, Lamellipodien und Uropodien, ist drastisch reduziert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten in nicht-stimulierten und CD3/CD28 costimulierten MV-behandelten T-Zellen einen nahezu kompletten Verlust an Mikrovilli und Lamellipodien. Die Bindung von MV induziert die Dephosphorylierung des F-Aktin-bindenden Proteins Cofilin und der ERM-Proteine. Es konnte demonstriert werden, dass der MV-Kontakt die Ausbildung einer reifen immunologischen Synapse stört. Trotz der morphologischen Veränderungen konjugieren MV-behandelte T-Zellen mit DCs. Die Anzahl MV-behandelter T-Zellen, die mit DCs interagieren, ist vergleichbar mit der mock-behandelter T-Zellen. Allerdings zeigt die 3-dimensionale Rekonstruktion der DC/T-Zell-Kontaktzone, dass in MV-behandelten T-Zellen die zentrale Akkumulation und Clusterbildung des CD3-Moleküls gestört ist und keine monozentrische Synapse ausgebildet wird. Desweiteren erfolgt die Relokalisation des MTOC in T-Zellen in Richtung der DC unvollständig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der MV Glykoproteinkomplex mit essentiellen Schritten einer erfolgreichen T-Zell-Aktivierung während der APC/T-Zell-Interaktion interferiert.

7.1. Summary

It was previously shown, that CD3/CD28-induced activation of PI3/Akt kinase pathway and proliferation are impaired in T cells after contact with the MV glycoprotein complex. As a result of PI3 kinase inactivation, membrane recruitment of PH domain containing proteins such as Akt kinase and the Rho GEF Vav, was abolished after CD3/CD28 coligation. The binding of MV interferes with CD3/CD28 coligation induced GTP-loading of the Rho GTPases, Cdc42 and Rac1. GTP-loading of RhoA was not impaired after MV treatment. Rather, RhoA was slightly activated by MV alone and this was enhanced upon CD3/CD28 ligation. Consistent with the failure of CD3/CD28 ligation to induce GTP-loading of Cdc42 and Rac1, polymerization of F-actin and morphological changes required for the formation of a contact plane such relaxation, flattening did not occur in MV treated T cells. MV treatment also efficiently interfered with the ability of T cells to adhere to ECM components. In contrast to mock treated, the majority of MV exposed T cells failed to acquire a polar front-rear organization. Thus, MV induced signaling efficiently impairs stimulation dependent reorganisation of the F-actin cytoskeleton and adhesion in T cells.

As revealed by scanning electron microscopy, exposure of T cells to MV induced an almost complete breakdown of microvillar structures which could also not be restored upon CD3/CD28 costimulation. The almost complete collapse of membrane protrusions in MV treated cells was associated with reduced phosphorylation levels of cofilin and ERM proteins. The ability of MV exposed T cells to interact with DCs and form DC/T-cells conjugates is not affected. MV signaling to T cells interfered with clustering and recruitment of CD3 into the central supramolecular activation cluster of the IS. MV also prevents the redistribution of the MTOC in T cells towards the synapse.

In summary, MV interferes with stimulated cytoskeleton remodeling, and this disturbs the ability of T cells to adhere, spread and cluster receptors essential for sustained activation. The signal given by the MV glycoprotein complex apparently prevents essential steps in APC/T cells interactions which are required for migration and successful activation.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Abschn. | Abschnitt |
| Abt. | Abteilung |
| AET | 2-Aminomethylisothiuroniumbromid |
| Akt | Akt8 virus oncogene cellular homolog |
| APC | Antigen-presenting cell |
| ATV | geeichte Trypsin-Versene Lösung |
| BCA | Bicistronic acid |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C- | Carboxy- |
| Cbl | Casitas B-lineage lymphoma |
| CBL | cellular homologue of Cas NS-1 oncogene |
| CD | Cluster of differentiation |
| CPE | cytopathic effect |
| d | Tag |
| 3D | 3-dimensional |
| DAG | Diacylglycerol |
| DC | Dendritic cell |
| DC-SIGN | DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin |
| dest. | destilliert |
| d.h. | das heißt |
| DIC | differential interference contrast |
| DMEM | Dulbecco's MEM Medium |
| DMSO | Dimethylsulfat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EAT-2 | EWS/Flil-activated transcript 2 |
| EBV | Ebstein Barr Virus |
| ECM | extracellular matrix |

| | |
|---------|---|
| ED | MV Vakzinestamm Edmonston |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eGFP | enhanced green fluorescent protein |
| EGTA | Ethylenglycerol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| Erk | extracellular signal-regulated kinase |
| ERM | Ezrin-Radixin-Moesin |
| F | MV Fusionsprotein |
| F-Aktin | filamentöses Aktin |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FAK | Fokale Adhäsionskinase |
| FERM | For: Ezrin-Radixin-Moesin |
| FIP | Fusion inhibitory peptide |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| Gads | Grb2-related adaptor downstream of Shc |
| GAM | Goat anti-Mouse IgG |
| GDP | Guanosin-5'-diphosphat |
| GEF | Guanine-nucleotide exchange factor |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony stimulating factor |
| GPI | Glykosylphosphatidylinositol |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| h | Stunde |
| H | MV Hämagglutininprotein |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HRP | Horseredish peroxidase |
| ICAM-1 | intracellular adhesion molecule 1 |
| IE | internationale Einheit |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| INF | Interferon |
| IS | Immunologische Synapse |
| ITAM | Immunrezeptor-Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotif |
| Jak | Janus-family tyrosine kinase |

| | |
|--------------|--|
| kDa | kilo Dalton |
| LAT | Linker for activation of T cells |
| Lck | lymphocyte-specific protein-tyrosin kinase |
| LFA-1 | Leukocyte function-associated antigen 1 |
| LIMK | LIM kinase |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LSM | Laserscanning Microscope |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MCP | membranständiges Kofaktorprotein (CD46) |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| MHC | Major Histocompatibility complex |
| min | Minute |
| mind. | mindestens |
| mM | millimolar |
| MoDC | Monocyte derived dendritic cell |
| MOI | Multiplicity of infection |
| MTOC | Microtubule organizing center |
| MV | Masernvirus |
| N- | NH ₂ - |
| NK | natural killer cells |
| NTE | NaCl-Tris-EDTA-Puffer |
| P- | Phospho- |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PFU | Plaque forming units |
| Phalloidin | aus: <i>Aminita phalloides</i> |
| PI3K | Phosphoinositol-3-Kinase |
| PIP2 | Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat |
| PIPES | Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC γ | Phospholipase γ |

| | |
|--------------------|---|
| PP1/2A | Phospho-protein phosphatase 1/2A |
| RhoGDI | GDP-Dissoziationsinhibitor für Rho GTPasen |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minutes |
| RSV | Respiratorisches Syncyticalvirus |
| RT | Raumtemperatur |
| SAP | SLAM-associated protein |
| SEA | Staphylococcus enterotoxin A |
| SEB | Staphylococcus enterotoxin B |
| SH2 | Scr homology 2 |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SLAM | Signalling Lymphocyte Activation Molecule (CD150) |
| SLP-76 | SH-2 domain-containing leucocyte protein of 76 kDa |
| SMAC | central supramolecular activation cluster |
| SOS | Son of sevenless guanine nucleotide exchange factor |
| SRBC | Sheep red blood cells |
| SSH | Slingshot phosphatase |
| STAT | Signal transducer and activator of transcription |
| Tab. | Tabelle |
| TCID ₅₀ | Tissue Culture Infectious Dosis 50 % |
| TCR | T-cell receptor |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TESK | Testis-spezifische Kinase |
| Th-Zellen | T-Helfer-Zellen |
| Triton | Polyethylenglycol-mono-[p-1,1,3,3-tetramethylbutyl]-phenyl]-ether |
| Tween | Polyoxyethylensorbitanmonolaureat |
| u.a. | unter anderem |
| UV | Ultraviolett |
| UZ | Ultrazentrifuge |
| Verd. | Verdünnung |
| VSV | Vesikuläres Stomatovirus |
| WASp | Wiskott-Aldrich Syndrom Protein |
| WB | Western Blot |

| | |
|--------|------------------------------|
| WHO | World Health Organisation |
| WTF | MV Wildtypvirus Fleckenstein |
| ZAP-70 | Zeta-associated protein 70 |
| z.B. | zum Beispiel |

9. Literatur

1. Modrow, S. & Falke, D. (1998). Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
2. Epidemiologisches Bulletin 29/2005
3. WHO Jahresbericht 2003
4. Robert-Koch-Institut: RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte, 2005
5. Koplik, H. (1896). The diagnosis of the invasion of measles from a study of exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. Arch. Pediatr. 12, 918-920
6. Clements, C.J., Cutts, F.T. (1995). The Epidemiology of Measles; Thirty Years of Vaccination. In: V. ter Meulen u. M. Billeter (Hrsg): Measles Virus, Current topics in Microbiology and Immunobiology 191 Verlag Springer, Berlin Heidelberg, S. 13-33
7. Griffin, D.E. (2001). Measles Virus. In: Fields Virology, 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1401-1442
8. Casali, P., Nakamura, M., McChesney, M.B. (1989). Immunosuppression by measles virus. In: Virus induced immunosuppression. (S. Spector, M. Bendinelli, and H. Friedmann, Eds.), Chap. 18, 345-373. Plenum Press, NY/London
9. Riley, E.C., Murphy, G., Riley, R.L. (1978). Airborne spread of measles in a suburban elementary school. Am. J. Epidemiol. 107, 421-432
10. Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Niewiesk, S., Klagge, I.M., Pfeuffer, J., Johnson, I.C.D., Schneider-Schaulies, J. Weidmann, A., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. (2001). The hemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells *in vitro*. J. Gen. Virol. 82, 1835-1844
11. Cosby, S.L., & Brankin, B. (1995). Measles virus infection of cerebral endothelial cells and effect on their adhesive properties. Vet. Microbiol. 44, 135-139
12. Esolen, L.M., Takahashi, K., Johnson R.T., Vaisberg, A., Moench, T.R., Wesselingh, S.L., Griffin, D.E. (1995). Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. J. Clin. Invest. 96, 2478-2481
13. Moench, T.R., Griffin, D.E., Obriecht, C.R., Vaisber, A.J., Johnson, R.T. (1988). Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. J. Infect. Dis. 158, 433-442

14. Kerdiles, Y.M., Sellin, C.I., Druelle, J., Horvat, B. (2005). Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev. Med. Virol.* in press
15. Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., et al. (2005). Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J. Virol.* 79, 7838-7844
16. Patterson, J.B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M.A., Oldstone M.B. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors *in vivo*. *Virology.* 267, 80-89
17. Valsamakis, A., Schneider, H., Auwaerter, P.G., Kaneshima, H., Billeter, M.A., Griffin, D.E. (1998). Recombinant measles virus with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes *in vivo*. *J. Virol.* 72, 7754-7761
18. Tober, C., Seuffer, M., Schneider, H. et al. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J. Virol.* 72, 8124-8132
19. Riedl, R., Moll, M., Klenk, H.D., Meisner, A. (2002). Measles virus matrix protein is cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res.* 26, 83(1-2):1-12
20. Wild, T.F., Malvoisin, E., Buckland, R. (1991). Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J. Virol.* 67, 6025-6032
21. Wild, T.F., Buckland, R. (1995). Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 191, 51-64
22. Bolt, G., Pederson, I.R. (1998) The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology.* 252, 387-398
23. Varsanyi, T.M., Jörnvall, H., Norrby, E. (1985). Isolation and characterisation of the measles virus F1 polypeptide: comparison with other paramyxovirus fusion proteins. *Virology.* 147, 110-117
24. Richardson, C.D., Hull, P., Greer, K., Hasel, A., Berkovich, G., Englund, W., Bellini, B., Rima, B., Lazzarini, R. (1986). The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses. *Virology.* 155, 508-523
25. Weidemann, A., Maisner, A., Garten, W., Seufert, M., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (2000). Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression *in vitro*. *J. Virol.* 74, 1985-1993
26. Doring, R.E., Marcil, A., Chopra, A., Richardson, C.D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 75, 295-305
27. Nanche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67, 6025-6032

28. McQuaid, S., Cosby, S.L. (2002). An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab. Invest.* 82, 403-409
29. Liszewski, M.K., Post, T.W., Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 431-455
30. Marie, J.C., Astier, A.L., Rivaller, P., Roubourdin-Combe, C., Wild, T.F., Horvat, B. (2002). Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell-induced inflammation. *Nat. Immunol.* 3(7), 659-665
31. Johnstone, R.W., Russell, S.M., Loveland, B.E., McKenzie, I.F. (1993). Polymorphic expression CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing. *Mol. Immunol.* 30, 1231-12141
32. Buchholz, C.J. et al. (1996). Selective expression of a subset of measles virus receptor-competent CD46 isoforms in human brain. *Virology.* 217, 349-355
33. Wang, G., Liszewski, M.K., Chan, A.C., Atkinson, J.P. (2000). Membrane cofactor protein (MCP, CD46): isoform-specific tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.* 164, 1839-1846
34. Kojima, A., Iwata, K., Seya, T., Matsumoto, M., Ariga, J., Atkinson, P., Nagasawa, S. (1993). Membrane cofactor protein (CD46) protects cells predominantly from alternative complement pathway-mediated C3-fragment deposition and cytolysis. *J. Immunol.* 151, 1519-1527
35. Astier, A., Trescol-Biemont, M.C., Azocar, O., Lamouille, B., Roubourdin-Combe, C. (2000) Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J. Immunol.* 164(12), 6091-6095
36. Kemper, C., Chan, A.C., Green, J.M., Brett, K.A., Murphy, K.M. Atkinson, J.P. (2003). Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature.* 421, 388-392
37. Kemper, C., Verbsky, J.W., Price, J.D., Atkinson, J.P. (2005). T-cell stimulation and regulation: with complements from CD46. *Immunol. Res.* 32(1-3), 31-44
38. Kallstrom, H., Islam, M.S., Bergren, P.O., Jonsson, A.B. (1998). Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J. Biol. Chem.* 269, 10776
39. Lecouturier, V., Fayolle, J., Caballero, M., Carabana, J., Celma, M.L., Fernandez-Munoz, R., Wild, T.F., Buckland, R. (1996). Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 down regulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J. Virol.* 70(7), 4200-4204
40. Nielsen, L., Blixenkron-Moller, M., Thylstrup, M., Hansen, N.J.V., Bolt, G. (2001). Adaption of wild-type measles virus to CD46 receptor usage. *Arch. Virol.* 146, 197-208

41. Loveland, B.E., Johnstone, R.W., Russell, S.M., Thorley, B.R., McKenzie, I.F.C. (1993). Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protect transfected cells against antibody and complement mediated lysis. *Transplant. Immunol.* 1, 101-108
42. Schneider-Schaulies, J., Dunster, L.M., Kobune, F., Rima, B., ter Meulen, V. (1995). Differential down regulation of CD46 by measles virus stains. *J. Virol.* 69, 7257-7259
43. Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J.J., Brinckmann, U., Dunster, L.M., Baczko, K., Liebert, U.G., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. (1995). Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92, 3943-3947
44. Schnorr, J.J., Dunster, M., Nanan, R., Schneider-Schaulies, J., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. (1995). Measles virus-induce down regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 976-984
45. Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 406, 893-897
46. Ono, N., Tatsuo, H., Hidaka, Y., Aoki, T., Minagawa, H., Yanagi, Y. (2001). Measles virus on throat swabs from measles patients use signalling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as cellular receptor. *J. Virol.* 75, 4399-4401
47. Welstead, G.G., Hsu, E.C., Iorio, C., Bolotin, S., Richardson, C.D. (2004). Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from host cell surface by measles virus hemagglutinin protein. *J. Virol.* 78(18), 9666-9674
48. Erlenhoefer, C., Wurzer, W.J., Loeffler, S., Schneider-Schaulies, S, ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J. Virol.* 75(19), 4499-4505
49. Cocks, B.G., Chang, C.C.J., Carballido, J.M., Yssel, H., de Vries, J.E., Aversa G. (1995). A novel receptor involved in T cell activation. *Nature.* 376, 260-263
50. Minagawa, H., Tanaka, K., Ono, N., Tasuo, H., Yanagi, Y. (2001). Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J. Gen. Virol.* 82, 2913-2917
51. Polacino, P.S., Pinchuk, L.M., Sidorenko, S.P., Clark, E.A. (1996). Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells. *J. Med. Primatol.* 25, 201-209
52. Punnonen, J., Cocks, B.G., Carballido, J.M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G., de Vries, J. (1997). Soluble and membrane-bound forms of signalling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J. Ex. Med.* 185, 993-1004
53. Chan, B., Lanyi, A., Song, H.K., Griesbach, J., Simarro-Grande, M., Poy, F., Howie, D., Sumegi, J., Terhorst, C., Eck, M.J. (2003). SAP couples Fyn to SLAM immune receptor. *Nat. Cell Biol.* 5, 155-160

54. Engel, P., Eck, M.J., Terhorst, C. (2003). The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 813-821
55. Howie, D., Simarro, M., Sayos, J., Guirado, M., Sancho, J., Terhorst, C. (2002). Molecular dissection of the signalling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood.* 99(3), 957-956
56. Nichols, K.M., Koretzky, G.A., June, C.H. (2001). SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation. *Nat. Immunol.* 2(8), 665-666
57. Morra, M. et al. (2001). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO.* 20(21), 5840-5852
58. Latour, S., Roncagalli, R., Chen, R., Bakinowski, M., Shi, X., Schwartzberg, P.L., Davidson, D., Veillette, A. (2003). Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat. Cell. Biol.* 5, 149-154
59. Hahm, B., Arbour, N., Oldstone, M.B.A. (2004). Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology.* 323, 292-302
60. Shibahara, K., Hotta, H., Katayama, Y., Homma, M. (1994). Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J. Gen. Virol.* 73, 4823-4828
61. Manchester, M., Eto, D.s., Valsamakis, A., Liton, P.B., Fernandez-Munoz, R., Rota, P.A., Bellini, W.J., Forthal, D.N., Oldstone, M.B. (2000). Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* 74, 3967-3974
62. Andres, O., Obojes, K., Kim, K.S., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. (2003). CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles virus. *J. Gen. Virol.* 84, 1189-1197
63. Duprex, W.P., McQuaid, S., Hangartner, L., Billeter, M.A., Rima, B.K. (1999). Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J. Virol.* 73, 9568-9575
64. Lawrence, D.M.P., Patterson, C.E., Gales, T.L., D'Orazio, J.L., Vaughn, M.M., Rall, G.F. (2000). Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytia formation, or extracellular virus expression. *J. Virol.* 74, 1908-1918
65. McQuaid, S., Campbell, S., Wallace, I.J., Kirk, J., Cosby, S.L. (1998). Measles virus infection and replication in undifferentiated and differentiated human neuronal cells in culture. *J. Virol.* 72, 5245-5250
66. Erlenhofer, C., Duprex, W.P., Rima, B.K., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. (2002). Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J. Gen. Virol.* 83, 1431-1436

67. Hashimoto, K., Ono, N., Tatsuo, H., Takeda, M., Takeuchi, K., Yanagi, Y. (2002). SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* 76, 6743-6749
68. Moss, W.J., Ota, M.O., Griffin, D.E. (2004). Measles: immune suppression and immune response. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1380-1385
69. Ryon, J.J., Moss, W.J., Monze, M., Griffin, D.E. (2002). Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized Zambian children with measles. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 994-1003
70. Borrow, P., Oldstone M.B. (1995). Measles virus-mononuclear cell interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 191, 85-100
71. Schneider-Schaulies, S., Schneider-Schaulies, J., Niewiesk, S., ter Meulen, V. (2002). Measles virus: immunomodulation and cell tropism as pathogenicity determinants. *Med. Microbiol. Immunol.* 191, 83-87
72. Dubois, B., Lamy, P.J., Chemin, K., Lachaux, A., Kaiserlian, D. (2001). Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell. Immunol.* 214, 173-183
73. Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivaller, P., Rissoan, M.-C., Liu, Y.-J., Rabourdin-Combe, C. (1997). Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* 186, 813-823
74. Grosjean, I., Caux, C., Bella, C., Berger, I., Wild, F., Banchereau, J., Kaiserlian, D. (1997). Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 186, 801-812
75. Klagge, I.M., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (2000). Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. *Eur. J. Immunol.* 30, 2741-2750
76. Schnorr, J.-J., Xanthakos, S., Keikavoussi, P., Kämpgen, E., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (1997). Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5326-5331
77. Steineur, M.-P., Grosjean, I., Bella, C., Kaiserlian, D. (1998). Langerhans cells are susceptible to measles virus infection and actively suppress T cell proliferation. *Eur. J. Dermatol.* 8, 413-420
78. Servet-Delprat, C., Vidalain, P.O., Bausinger, H., Manie, S., Le Deist, F., Azocar, O. et al. (2000). Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J. Immunol.* 164, 1753-1760
79. Atabani, S.F., Byrnes, A.A., Jaye, A., Kidd, I.M., Magnusen, A.F., Whittle, H. (2001). Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production. *J. Infect. Dis.* 184, 1-9

80. Klagge, I.M., Abt, M., Fries, B., Schneider-Schaulies, S. (2004). Impact of measles virus dendritic-cell infection on Th-cell polarization *in vitro*. J. Gen. Virol. 85, 3239-3247
81. Moss, W.J., Ryon, J.J., Monze, M., Griffin, D.E. (2002). Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. J. Infect. Dis. 186, 879-887
82. Hamalainen, H., Meissner, S., Lahesmaa, R. (2000). Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. J. Immunol. Methods. 242, 9-19
83. Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W. et al. (2004). The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. J. Exp. Med. 199, 1255-1264
84. Tanaka, K., Minagawa, H., Xie, M.F., Yanagi, Y. (2002). The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). Arch. Virol. 147, 195-203
85. Nanche, D., Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R.M., Oldstone, M.B.A. (2000). Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infections interferes with induction of alpha/beta interferon production. J. Virol. 74, 7478-7484
86. Takeuchi, K., Kadota, S., Takeda, M., Miyajima, N., Nagata, K. (2003). Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not INF-gamma signalling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. FEBS Letters. 545, 177-182
87. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman R.H., Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem. 67, 227-264
88. Goodbourn, S., Didcock, L., Randall R.E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. J. Gen. Virol. 81, 2341-2364
89. Sanchez-Lanier, M., Guerlin, P., McLaren, L.C., Bankhurst, A.D. (1998). Measles-induced suppression of lymphocyte proliferation. Cell. Immunol. 116, 367-381
90. Schlender, J., Schnorr, J.J., Spielhofer, T., Cattomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M.A., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (1996). Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 13194-13199
91. Weidmann, A. Fischer, C., Ohgimoto, S., Ruth, C., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (2000). Measles virus-induced immunosuppression *in vitro* is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. J. Virol. 74(16), 7548-7553
92. Schneider-Schaulies, S., Bieback, K., Avota, E., Klagge, I.M., ter Meulen, V. (2002). Regulation of gene expression in lymphocytes and antigen-presenting cells by measles virus: consequences for immunomodulation. J. Mol. Med. 80, 73-85

93. Engelking, O., Federov, L.M., Lilischkis, R., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (1999). Measles virus-induced immunosuppression *in vitro* is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 1599-1608
94. Schnorr, J.J., Seufert, M., Schlender, J., Borst, J., Johnstone, I.C., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (1997). Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 78, 3217-3226
95. Avota, E., Avots, A., Niewiesk, N., Kane, L.P., Bommhardt, U., ter Meulen, V. (2001). Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat. Med.* 7, 725-731
96. Avota, E., Müller, N., Klett, M., Schneider-Schaulies, S. (2004). Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *J. Virol.* 78(17), 9552-9559
97. Krawczyk, C., Penninger, J.M. (2001). Molecular motors involved in T cell receptor clusterings. *J. Leukoc. Biol.* 69, 317-330
98. Kane, L.P., Lin, J., Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 242-249
99. Leo, A., Schraven, B. (2001). Adapters in lymphocyte signalling. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 307-316
100. Janssen, E. Zhang, W. (2003). Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 269-276
101. Samstag, Y., Eibert, S.M., Klemke, M., Wabnitz, G. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* 73, 30-48
102. Miletic, A.V., Swat, M., Fujikawa, K., Swat, Wojcietch, S. (2003). Cytoskeletal remodeling in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 261-268
103. Cantrell, D.A. (2003). GTPases and T cell activation. *Immunol Rev.* 192, 122-130
104. Bunnell, S.C., Kapoor, V., Triple, R.P., Zhang, W., Samelson, L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity.* 14, 315-329
105. Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., Lanzavecchia, A. (1995). Sustained signalling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.* 181, 577-584
106. Dustin, M.L., Cooper, J.A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signalling. *Nat. Immunol.* 1, 23-29
107. Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, A.A., Bernard, O., Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of Cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 393, 805-809

108. 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
109. Toshima, J., Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., Mizuno, K. (2001). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1131-1145
110. Toshima, J., Toshima, J.Y., Takeuchi, K., Mori, R., Mizuno, K. (2001). Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31449-31458
111. Ambach, A., Saunus, J., Konstandin, M., Wesselborg, S., Meuer, S.C., Samstag, Y. (2000). The serine phosphatases PP1 and PP2 associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 30, 3422-3431
112. Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase slingshot and its role in insulin-induced membrane protrusion. *J. Biol. Chem.* 279(8), 7193-7198
113. Huppa, J.B., Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 973-983
114. Appleman, L.J., Boussiotis, V.A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol. Rev.* 192, 161-180
115. Boes, M., Ploegh, H.L. (2004). Translating cell biology *in vitro* to immunity *in vivo*. *Nature*. 430, 264-271
116. Sechi, A.S., Buer, J., Wehland, J., Probst-Kepper, M. (2002). Changes in actin dynamics T-cell/APC interface: implications for T-cell anergy? *Immunol. Rev.* 189, 98-110
117. Sechi, A.S., Wehland J. (2004). Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *TRENDS Immunol.* 25(5), 257-265
118. Lin, J., Miller, M.J., Shaw, A.S. (2005). The c-SMAC: sorting it all out (or in). *J. Cell Biol.* 170 (2), 177-182
119. Jacobelli, J., Andres, P.G., Boisvert, J., Krummel, M.F. (2004). New views of the immunological synapse: variations in assessment and function. *Curr. Opin. Immunol.* 16(3), 345-352
120. Mempel, T.R., Henrickson, S.E., Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 427, 154-159
121. Wetzel, S.A., McKeithan, T.W., Parker, D.C. (2002). Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J. Immunol.* 169, 6092-6101

122. van der Merwe, P.A., Davis, S.J., Shaw A.S., Dustin, M.L. (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell recognition. *Sem. Immunol.* 12(1), 5-21
123. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 285, 221-227
124. Delon, J., Stoll, S., Germain, R.N. (2002). Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and intact lymphoid tissue. *Immunol. Rev.* 189, 51-63
125. Davis, D.M., Dustin, M.L. (2004). What is the importance of the immunological synapse? *TRENDS Immunol.* 25(6), 323-327
126. Friedl, P., Storim, J. (2004). Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *TRENDS Cell Biol.* 14(10), 557-567
127. Friedl, P., den Boer, A.Th., Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 532-545
128. Montoya, M.C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. (2002). Cell adhesion and polarity during immune interactions. 186, 68-82
129. Ivetic, A., Ridley, A.J. (2004). Ezrin/Radixin/Moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology.* 112, 165-176
130. Das, V. et al. Membran-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation. *Immunol. Rev.* 189, 123-135
131. Cullinan, P., Sperling, A.I., Burkhardt, J.K. (2002). The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol. Rev.* 189, 111-122
132. Yonemura, S., Nagafuchi, A., Sato, N., Tsukita, S. (1998). Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell. Biol.* 140, 885-895
133. Takahashi, K. et al. (1998). Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene.* 16, 3279-3284
134. Poulet, P., Gautreau, A., Kadare, G., Girault, J.A., Louvard, D., Arpin, M. (2001). Ezrin interacts with focal adhesion kinase and induces its activation independently of cell-matrix adhesion, *J. Biol. Chem.* 276, 37686-37691
135. Sanchez-Madrid, F., del Pozo, M.A. (1999). Leukocyte polarization in the cell migration and immune interactions. *EMBO.* 18(3), 501-511
136. Vincente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature.* 4,110-121

137. Wilkinson, P.C. (1986). The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth. *Immunology*. 57, 281-289
138. Wessels, D., Soll, D., Knecht, D., Loomis, W.F., DeLozanne, A., Spudich, J.A. (1988). Cell motility and chemotaxis in amoebae lacking myosin heavy chain. *Dev. Biol.* 128, 164-177
139. Fais, S., Malorni, W. (2003). Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *J. Leukoc. Biol.* 73, 556-563
140. Kupfer, H., Singer, S.J. (1989). Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and couples. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 309-337
141. Pribila, J.T., Quale, A.C., Mueller, K.L., Shimizu, Y. (2004). Integrines and T cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 157-180
142. Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A., Unanue, E.R. (1997). Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3909-3913
143. Dustin, M.L. et al. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell.* 94, 667-677
144. Sancho, S., Vicente-Manzanares, M., Mittelbrunn, M., Montoya, M.C., Gordon-Alonso, M., Serrador, J.M., Sanchez-Madrid. (2002). Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol. Rev.* 189, 84-97
145. Wehrle-Haller, B., Imhof, B.A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesions dynamics during cell migration. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35, 39-50
146. Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., Sodeik, B. (2002). Function of dynamin and dynactin in Herpes Simplex Virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell.* 13, 2795-2809
147. Slaughter, N., Laux, I., Tu, X., Whitelegge, J., Zhu, X., Effros, R., Bickel, P., Nel, A. (2003) The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin. Immunol.* 108(2), 138-151
148. Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W., Samelson, L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity.* 14, 315-329
149. Bunnell, S.C., Hong, D.I., Kardon, J.R., Yamazaki, T., McGlade, C.J., Barr, V.A., Samelson, L.E. (2002). T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signalling assemblies. *J. Cell Biol.* 158 (7), 1263-1275
150. Zaffran, Y., Destaing, O., Roux, A., Ory, S., Nheu, T., Jurdic, P., Roubourdin-Combe, C., Astier, A.L. (2001). CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T

cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* 176, 6780-6785

151. Nobes, C.D., Hall, A. (1995). Rho, rac, cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibres, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81(1), 53-62

152. Nijhara, R., van Hennink, P.B., Gignanc, M.L., Kruhlak, M.J., Hordijk, P.L., Delon, J., Shaw, S. (2004). Rac1 mediates collapse of microvilli on chemokine-activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 173, 4985-4993

153. Faure, S., Salazar-Fontana, L., Semichon, M., Tybulewicz, V.L.J., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R.N., Delon, J. (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat. Immunol.* 3, 272-279

154. Fischer, K.D. et al. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* 8, 554-562

155. Pастey, M.K., Gower, T.L., Spearman, P.W., Crowe, J.E., Graham, B.S. (2000). A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nature.* 6(1), 35-40

156. Laine, D. et al. (2003). Measles Virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J. Virol.* 77(21), 11332-11346

157. McCurdy, L.H., Graham, B.S. (2003). Role of plasma membrane lipid microdomains in Respiratory Syncytial Virus Filament Formation. *J. Virol.* 77(3), 1747-1756

158. Dhiman, N., Jacobson, R.M., Poland, G.A. (2004). Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev. Med. Virol.* 14, 217-229

159. Howie, D., Simarro, M., Sayos, J., Guirado, M., Sancho, J., Terhorst, C. (2002). Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Immunobiology.* 99(3), 957-965

160. Hofer, S., Pfeil, K., Niederegger, H., Ebner, S., Nguyen, V., Kremmer, E., Auffinger, M., Neyer, S., Fürhapter, C., Heufler, C. (2006). Dendritic cells regulate T-cell de-attachment through the integrin-interacting protein CYTIP. *Blood.* 107(3), 1003-1009

161. Sanchez-Martin, L. et al. (2004). Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. *J. Biol. Chem.* 279(16), 16194-16205

162. Erlandsen, S.L., Hasslen, S.R., Nelson, R.D. (1993). Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 327-333

163. von Andrian, U.H., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Erlandsen, S.L., Butcher, E.C. (1995). A central role for microvillous receptor presentation in leucocyte adhesion under flow. *Cell*. 82, 989-999
164. Snapp, K.R. Heitzig C.E. Kansas, G.S. (2002). Attachment of the PSGL-1 cytoplasmic domain to the actin cytoskeleton is essential for leucocyte rolling on P-selectin. *Blood*. 99, 4494-4502
165. Ivetic, A., Deka, J., Ridley, A., Ager, A. (2002). The cytoplasmic tail of L-selectin interacts with members of the ezrin-radixin-moesin (ERM) family of proteins: cell activation-dependent binding of moesin but not ezrin. *J. Biol. Chem.* 277, 2321-2329
166. Brown, M.J., Nijhara, R., Hallam, J.A., Gignac, M., Yamada K.M., Erlandsen, S.L., Delon, J., Kruhlak, M., Shaw, S. (2003). Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli. *Blood*. 102(12), 3890-3899
167. Brown, J.M., Nijhara, R., Hallam, J.A., Gignac, M., Yamada, K.M., Erlandsen, S.L., Delon, J., Kruhlak, M., Shaw, S. (2003). Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarisation. *Blood*. 102(12), 3890-3899
168. Majstoravich, S., Zhang, J., Nicholson-Dykstra, S., Linder, S., Friedrich, W., Siminovitch, K.A., Higgs, H.N. (2004). Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood*. 104(5), 1396-1403
169. Nakamura, F., Amieva, M.R., Furthmayer, H. (1995). Phosphorylation of threonin 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J. Biol. Chem.* 270, 31377-31385
170. van Ewijk, W., Brons, N.H., Rozing, J. (1975). Scanning electron microscopy of homing and recirculating lymphocyte population. *Cell Immunol.* 19, 245-261
171. Anderson, A.O., Anderson, N.D. (1976). Lymphocyte emigration from high endothelial venules in rat lymph nodes. *Immunology.* 31, 731-748
172. Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H., Cahalan, M.D. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity.* 4, 421-430
173. Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R., Trautmann, A. (1998). Antigen-dependent and -independent Ca²⁺ responses triggered in T cell by dendritic cells compared with B cells. *J. Ex. Med.* 188, 1473-1484
174. del Pozo, M.A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J.M., Sanchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29, 3609-3620
175. Ridley, A.J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11, 471-477

176. Heissmeyer, V., Macian, F., Im, S.H. et al. (2004). Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat. Immunol.* 5, 255-265
177. Richie, L.I. et al. (2002). Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3 ξ to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity.* 16, 595-606
178. Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K., Mizuno, K. (2005). Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J. Cell Biol.* 171(2), 349-359
179. Bamburg, J.R. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 185-230
180. Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., Mizuno, K. (2001). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Chem.* 12,1131-1145
181. Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell.* 108(2), 233-246
182. Wiggan, O., Bernstein, B.W., Bamburg, J.R. (2005). A phosphatase for cofilin to be HAD. *Nat. Cell Biol.* 7(1), 8-9
183. Gohla, A., Birkenfeld, J., Bokoch, G.M. (2005). Chronophin, a novel HAD-type serin protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* 7(1), 21-29
184. Huang, T.Y., DerMardirossian, C., Bokoch, G.M. (2005). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 1-6
185. Rima, B.K., Duprex, W.P. (2006). Morbillivirus and human disease. *J. Pathol.* 208, 199-214
186. Sidorenko, S.P., Clark, E.A. (2003). The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat. Immunol.* 4(1), 19-24

10. Veröffentlichungen

Publikationen

Avota, E., **Müller, N.**, Klett, M., Schneider-Schaulies, S. (2004). Measles Virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *J. Virol.* 78, 9552-9559.

Müller, N., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Harms, H., Krohne, G., Schneider-Schaulies, S. (2006). Measles Virus contact impedes cytoskeletal remodeling associated with T cell adhesion, spreading and CD3 clustering in the immunological synapse. *Angenommen.*

Vorträge

Regulation of small GTPases and cytoskeleton proteins in MV contacted T cells

XI. Masern Virus Treffen, Flein 2002

Cytoskeletal rearrangments in MV contacted T cells

XII. Masern Virus Treffen, Würzburg 2003

MV regulates cytoskeleton in T cells

XIII. Masern Virus Treffen, Würzburg 2004

Measles Virus (MV) regulates T cell receptor signaling and cytoskeletal proteins in a contact dependent manner

Arbeitskreis Zellbiologie der Gesellschaft für Virologie, Zeilitzheim 2004

Measles Virus (MV) regulates T cell receptor signaling and cytoskeletal proteins in a contact dependent manner

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen 2004

Poster

Cloning and expression of soluble MV fusion protein.

Müller, N., Weissenhorn, W., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S.
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin 2003

MV regulates T cell receptor signaling molecules and cytoskeletal rearrangement in a contact dependent manner.

Müller, N., Avota, E., Schneider-Schaulies, S.
Jahrestagung der Gesellschaft für Signaltransduktion, Weimar 2003

MV regulates T cell receptor signaling molecules and cytoskeletal rearrangement in a contact dependent manner.

Müller, N., Avota, E., Schneider-Schaulies, S.
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover 2005

MV regulates T cell receptor molecules and cytoskeleton proteins in a contact dependent manner.

Müller, N., Avota, E., Schneider-Schaulies, S.
Jahrestagung der Gesellschaft für Immunologie, Kiel 2005

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Fr. Prof. S. Schneider-Schaulies für die Betreuung der Arbeit, die Unterstützung und ihr stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Hr. Prof. F. Grummt für die Betreuung der Arbeit seitens der Fakultät für Chemie.

Für die Zusammenarbeit und stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung mit der konfokalen Mikroskopie gilt Dr. H. Harms mein besonderer Dank.

Hr. Prof. G. Krohne und Mitarbeitern der Abt. Elektronenmikroskopie danke ich für die freundliche Einführung in die Rasterelektronenmikroskopie.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe von Fr. Prof. S. Schneider-Schaulies und des Institutes für Virologie und Immunbiologie hilfsbereite, freundliche und humorvolle Atmosphäre.

12. Lebenslauf

Name: Nora Müller

Geburtsdatum: 11.09.1973

Geburtsort: Altenburg, Thüringen

Schulbildung: 1980-1990
ehem. Oberschule „DSF“ Ehrenberg

Abitur: 1990-1992
ehem. Friedrichgymnasium Altenburg

Studium: 1993-2000
Studiengang Biochemie an der Universität Leipzig
1995-1996
1 Jahr Unterbrechung für soziale Tätigkeit

Diplom: 1999-2000
Diplomarbeit an der Forschungsstelle der Max-Planck-Gesellschaft
Abschluß als Diplom-Biochemikerin

Berufl. Tätigkeit: 2000
Studentin im neurowissenschaftlichen Graduiertenkolleg an der
Universität Leipzig
2001-2005
Doktorarbeit am Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg
seit April 2005 wissenschaftliche Angestellte am Institut für
Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg