

Aus dem Bereich Physiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Identifikation der Munc13 Isoformen und ihre Funktion während der Sekretion von Lysosomen in T-Lymphozyten

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften**

**der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2012

vorgelegt von

Monika Dudenhöffer-Pfeifer
geboren am: 04.10.1977 in Pirmasens

Erstgutachter: Prof. Dr. Jens Rettig

Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Schmitz

Life is like a box of chocolates. You never know what you're gonna get.

Forrest Gump

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung	3
3. Summary	4
4. Einleitung	5
4.1 Immunsystem	5
4.1.1 Angeborene oder unspezifische Immunabwehr	5
4.1.2 Erworbene oder spezifischen Immunabwehr	7
4.2 Zytotoxische T-Lymphozyten	9
4.3 Die Immunologische Synapse	11
4.4 Signaltransduktion in T-Lymphozyten	12
4.5 Zytotoxizität	15
4.5.1 Perforin/Granzym Signalweg	16
4.5.1.1 Sekretion der Lysosomen mit Hilfe von SNAREs und regulatorischen Proteine	17
4.5.1.2 Munc13-Familie	21
4.5.1.3 Genetische Defekte und Erkrankungen des Immunsystems aufgrund beeinträchtigter Exozytose von lytischen Granulen	23
4.5.1.3.1 Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) und familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose (FHL)	24
4.5.2 Fas/FasL Signalweg	26
4.6 Aufgabenstellung / Zielsetzung der Arbeit	29
5. Material	30
5.1 Chemikalien	30
5.2 Farbstoffe	31
5.3 Molekularbiologische und biochemische Kits	31
5.4 Größenstandards DNA/Proteine	31
5.5 Enzyme	31
5.6 Antikörper	32
5.6.1 Primäre Antikörper	32
5.6.2 Sekundäre Antikörper	32
5.7 Plasmide	33
5.7.1 Virusplasmid	33

5.7.2	Transfektionsplasmide	33
5.8	Oligonukleotide	33
5.8.1	Klonierungsnukleotide für mMunc13-4	33
5.8.2	Sequenzierungsnukleotide für mMunc13-4	33
5.8.3	Oligonukleotide für die Genotypisierung	34
5.8.4	Oligonukleotide für alle Isoformen von Munc13	34
5.9	Allgemeine Lösungen und Puffer	35
5.10	Medien und Agarplatten	35
5.11	Spezielle Geräte und weiteres Material	36
5.12	Software	37
6.	Methoden	38
6.1	Tiermodelle	38
6.2	Primärzellen und Zelllinien	38
6.2.1	CD8+ T-Lymphozyten	38
6.2.1.1	Zellisolation und Proliferation	38
6.2.2	Antigenpräsentierende Zellen	39
6.2.3	Chromaffinzellen	39
6.2.3.1	Zellisolation und Zellkultur	40
6.3	Physiologische und immunologische Methoden	41
6.3.1	Patch Clamp und Kapazitätsmessungen	41
6.3.1.1	Photolyse der NP-EGTA zur Auslösung des Kalziumsignals	43
6.3.1.2	Kalziummessung während der Kapazitätsmessungen	43
6.3.2	Video-Imaging	43
6.3.2.1	Aufbau des Fluoreszenzmikroskopmessplatzes	44
6.3.2.2	Intrazelluläre Kalziumkonzentrationsmessungen $[Ca^{2+}]_i$	42
6.3.3	Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM)	44
6.3.3.1	Einzelzellassay	45
6.3.4	^{51}Cr -Freisetzungssassay	46
6.3.5	Durchflusszytometrie	47
6.3.5.1	Degranulationsassay	48
6.4	Biochemische Methoden	48
6.4.1	Proteinisolierung aus Gewebe und Zellen	48
6.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay	49
6.4.3	Antikörper gegen Munc13-4	50

6.4.3.1	Herstellung von Antikörpern	50
6.4.3.2	Aufreinigung des Munc13-4-Antikörpers	50
6.4.3.2.1	Affinitätschromatographie	50
6.4.4	Dot Blot	52
6.4.5	Western Blot	52
6.4.6	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	53
6.4.6.1	Granzym B ELISA	54
6.5	Morphologische Methoden	54
6.5.1	Immunfärbung	54
6.5.2	Elektronenmikroskopie	55
6.6	Mikrobiologische Methoden	56
6.6.1	Herstellung von Plattenkulturen	56
6.6.2	Flüssigkulturen von <i>E.coli</i>	56
6.6.3	Transformation von <i>E.coli</i>	57
6.6.3.1	Hitzeschock-Transformation	57
6.7	Molekularbiologische Methoden	57
6.7.1	Isolierung, Aufreinigung und Aufarbeitung von Nukleinsäuren	57
6.7.1.1	Plasmid-Isolierung	57
6.7.1.1.1	Plasmid-Minipräparation	58
6.7.1.1.2	Plasmid-Midipräparation	58
6.7.1.1.3	Plasmid-Maxipräparation	58
6.7.1.1.4	Isolierung genomischer DNA	59
6.7.1.1.4.1	Genotypisierung	59
6.7.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA	60
6.7.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	61
6.7.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	61
6.7.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	62
6.7.4.1	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	63
6.7.4.2	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	65
6.7.5	Sequenzierung	66
6.7.6	Klonierung der Munc13-4-Konstrukte	66
6.7.6.1	Amplifizierung und Midipräparation der cDNA von Munc13-4	66
6.7.6.2	Restriktion der PCR-Fragmente und des Expressionsvektors	66

6.7.6.3	Ligation der restingierten PCR-Fragmente mit dem Expressionsvektor	67
6.7.7	Transfektion der Plasmide in die CD8+ T-Lymphozyten	67
6.7.8	Infizierung der Chromaffinzellen mittels des Semliki-Foest-Virus	68
6.8.	Gelelektrophorese Systeme	68
6.8.1	Agarose-Gele zur DNA-Analyse	68
6.8.2	Formaldehyd (FA)-Agarosegele zur Auftrennung isolierter Gesamt-RNA	69
6.8.3	SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	69
7.	Ergebnisse	70
7.1	Charakterisierung der isolierten Splenozyten und CD8+ T-Lymphozyten	70
7.1.1	Vergleich der Splenozyten und CD8+ T-Lymphozytenpopulation in WT und Munc13-4-KO Mäusen	70
7.1.2	Nachahmung der physiologischen Stimulation von CD8+ T-Lymphozyten durch anti-CD3/CD28 Beadstimulation	72
7.1.3	Analyse der Funktionalität von Ionenkanälen und Kalziumspeichern anhand von Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_{cyt}$	73
7.2	Transkription und Expression von Munc13 Isoformen	74
7.2.1	Expression von Munc13-4 in verschiedenen Geweben	74
7.2.2	Transkription von Munc13 Isoformen in CD8+ T-Lymphozyten	75
7.2.2.1	Quantitativer mRNA-Nachweis von Munc13-1 und Munc13-4	76
7.2.3	Munc13-1 und Munc13-4 in CD8+ T-Lymphozyten	77
7.2.3.1	Expression von Munc13-1 in CD8+ T-Lymphozyten	77
7.2.3.2	Expression und Regulation von Munc13-4 in CD8+ T-Lymphozyten	78
7.2.3.3	Lokalisation von Munc13-4 in CD8+ T-Lymphozyten	79
7.3	Charakterisierung der immunologischen Synapse	81
7.3.1	CD3-Verteilung in CD8+ T-Lymphozyten	81
7.3.2	α -Tubulin-Lokalisation nach Ausbildung der IS mittels anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen	83
7.4	Untersuchung der Sekretionsereignisse in CTLs	84

7.4.1	Analyse der Sekretion von Granzym B	84
7.4.2	Analyse der Sekretion von Lysosomen	86
7.4.2.1	Degranulation von Lysosomen in WT und Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten	86
7.4.2.2	Rescue der Degranulation von Lysosomen in Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten durch Überexpression von Munc13-4	88
7.4.2.3	Rescue der Degranulation von Lysosomen in Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten durch Überexpression von Munc13-1	90
7.5	Morphologische Untersuchungen der CD8+ T-Lymphozyten nach Bildung einer IS mittels anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen	95
7.6	Zytotoxizität der WT und Munc13-4-KO CTLs	97
7.6.1	⁵¹ Cr-Freisetzungssassay	97
7.6.2	Apoptoseuntersuchung anhand von Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in den APC	99
7.6.2.1	Intrazelluläre Kalziumkonzentrationmessung $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der CTL und APC während der IS Bildung und des Abtötens	99
7.6.2.2	Expression von FasL in CD8+ T-Lymphozyten	104
7.6.2.2.1	Immunfärbung von FasL in CD8+ T-Lymphozyten	105
7.6.2.3	Intrazelluläre Kalziumkonzentrationsmessungen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der CTL und APC während der IS Bildung und des Abtötens nach Blockierung des Fas/FasL-Signalwegs	106
7.7	Einfluss von Munc13-4 auf die Exozytose von dens core Vesikel in Chromaffinzellen	111
8.	Diskussion	114
8.1	Jinx-Maus als FHL 3 Modell	114
8.2	Transkription und Expression von Munc13 Isoformen	115
8.3	Charakterisierung der immunologischen Synapse	118
8.4	Untersuchung der Sekretionsereignisse in den CD8+ T-Lymphozyten	119
8.5	Morphologische Untersuchungen der CTLs nach Bildung einer IS mittels CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen	122
8.6	Zytotoxizität der WT und Munc13-4-KO CTLs	123
8.7	Einfluss von Munc13-4 auf die Exozytose von dens coreVesikel in Chromaffinzellen	124

9. Literaturverzeichnis	126
10. Danksagung	144
11. Publikationen	145
12. Lebenslauf	146

1. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antigen-dependent cellmediated cytotoxicity
APAF1	Apoptotic protease-activating factor 1
APC	Antigen-presenting cell
Bak	Bcl-2 homologous antagonist
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BH	Bcl-2-homology
CD	Cluster of differentiation
CRAC	Ca ²⁺ release activated Ca ²⁺
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4
DAG	Diazylglyzerol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-associated death domain protein
Fc	Crystallisable fragment
FHL	Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HLH	Hemophagocytic lymphohistiocytosis
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IS	Immunologische Synapse
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
Lamp	Lysosomal associated membrane proteins
LAT	Linker of activated T-cells
LCK	Leucocyte specific tyrosine kinase
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis virus
LFA-1	Leucocyte function associated antigen 1
MCMV	Mouse cytomegalovirus

MHC	Major histocompatibility complex
MHD	Munc homology domain
MOI	Multiplicity of infection
MTOC	Microtubuli organisation center
NCR	Natural cytotoxic receptor
NEU	N-ethyl-N-nitrosourea
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Transcription factors nuclear κ B
NK	Natural killer cell
NP-EGTA	Nitrophenyl-EGTA
PE	Phycoerythrin
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase in der Plasmamembran
Rab	Ras-related in brain
SERCA	Sarcoendoplasmatisches Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SLP	SRC-homology-2-domain-containing leukocyte protein
SMAC	Supra-molecular adhesion complex
SNARE	Soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor accessory-protein receptor
SNAP	Synaptosomal-associated protein
SNP	Single nucleotide polymorphism
STIM	Stromal interaction molecule
TCR	T-cell receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Vamp	Vesicle-associated membrane protein
ZAP70	ζ -chain-associated protein of 70 kDa

2. Zusammenfassung

Zytotoxische T-Lymphozyten sind Zellen des Immunsystems, die die Funktion besitzen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zu töten. Dazu verfügen sie über zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen sezernieren sie zytotoxische Proteine aus den lytischen Granulen oder sie induzieren die Apoptose in den Zielzellen mittels Interaktion des Oberflächenproteins Fas der APCs und des Oberflächenproteins FasL der CTLs. In dieser Arbeit werden Ergebnisse zu beiden Signalwegen beschrieben.

Um die zytotoxische Funktion der CTLs zu untersuchen, wurde eine knockout Mauslinie verwendet, der der mutmaßliche Primingfaktor Munc13-4 für die lytischen Granulen fehlt. Deletion oder Mutationen des Munc13-4 Gens verursachen die hämophagozytische Lymphohistiozytose Typ 3, eine lebensbedrohliche Immunerkrankung. Der Verlust des Munc13-4 Proteins führt zu einer dramatischen Reduktion der Zytotoxizität.

Des Weiteren konnte ein weiteres Mitglied der Munc13 Familie mittels RT-PCR in CD8+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die fehlende Sekretionsleistung kann durch die Überexpression von Munc13-4 oder Munc13-1 in Munc13-4-KO Zellen wieder hergestellt werden. Durch die Resultate der Rescueexperimente mit Munc13-1 deutet dies auf eine gleichwertige Funktion hin. Durch das große Ausmaß des Sekretionsverlustes ($85 \% \pm 4 \%$) in Munc13-4-KO CTLs scheint Munc13-4 der hauptsächliche Primingfaktor zu sein. Im Gegensatz dazu spielt Munc13-1 wohl keine große Rolle in der Sekretion von Granzym B. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit der fehlenden Proteindetektion im Western Blot in WT CD8+ T-Lymphozyten - trotz des Nachweises von Munc13-1 mRNA. Allerdings könnte Munc13-1 eine signifikante Rolle unter pathophysiologischen Bedingungen einnehmen, indem die Hochregulation von Munc13-1 ein möglicher Therapieansatz für die hämophagozytische Lymphohistiozytose Typ 3 sein könnte.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in Munc13-4-KO CTLs verbliebene Zytotoxizität wahrscheinlich über den Fas/FasL-Signalweg abläuft. Dies bedeutet, dass der Fas/FasL-Signalweg in CTLs der Maus einen signifikanten Beitrag zu der Gesamtzytotoxizität liefert. Darüber hinaus verwenden offensichtlich die sekretorischen Lysosomen, die den FasL zur Zellmembran transportieren einen anderen Primingmechanismus als die lytischen Granulen selbst.

3. Summary

Identification of Munc13 isoforms and their functions in T-lymphocytes

Cytotoxic T-lymphocytes are cells of the immune system whose function is to kill virus infected cells and tumor cells. For this purpose they either secrete cytotoxic proteins via exocytosis of lytic granules or induce apoptosis by activation of the APC surface protein Fas by the CTL surface protein FasL. Experimental results from both pathways are reported here.

To investigate the cytotoxic function of CTLs, a knockout mouse line was used in which the priming factor for lytic granules, Munc13-4, is deleted. Deletion or mutation of Munc13-4 gene causes hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3, a fatal immune disorder. Loss of Munc13-4 leads to a dramatic reduction of granzyme B secretion from the CD8⁺ T-lymphocytes which is reflected in a reduction of cytotoxicity.

In addition, Munc13-1, another member of the Munc13 family was detected in CD8⁺ T-lymphocytes by RT-PCR. Secretion of lysosomes was recovered following overexpression of either Munc13-4 or Munc13-1 in Munc13-4 KO cells. Rescue of secretion with Munc13-1 indicates that its function is equivalent to that of Munc13-4. However the strong loss of secretion (85 % \pm 4 %) in the Munc13-4 KO CTLs indicates that Munc13-4 is the major priming factor in CTLs and that Munc 13-1 does not play a major role in granzyme B release. This conclusion is consistent with the lack of Munc13-1 protein in the Western Blots from WT CTLs, in spite of the presence of Munc13-1 mRNA. However Munc13-1 could play a significant role under pathophysiological conditions and the upregulation of Munc13-1 might provide a therapeutic approach to treatment of the hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. Furthermore, the cytotoxicity remaining in Munc13-4 KO CTLs is likely due to killing via the Fas/FasL pathway. This indicates that the Fas/FasL pathway in CTLs of mice makes a significant contribution to the total cytotoxicity and that the secretory lysosomes which deliver FasL to the plasma membrane utilize a different priming mechanism than that used by lytic granules.

4. Einleitung

4.1 Immunsystem

Der menschliche Organismus kommt im Laufe seines Lebens mit einer Vielzahl von pathogenen Keimen, wie Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen, aber auch körpereigenen entarteten Zellen in Berührung. Dadurch kann es zu lebensbedrohlichen Infektionen oder zumindest zu erheblichen Beeinträchtigungen bzw. zu Störungen des physiologischen Funktionsablaufs des Organismus kommen. Deshalb muss sich dieser zunächst vor diesen Mikroorganismen schützen und im Fall, dass es ihnen doch gelungen ist in den Körper einzudringen, diese zu bekämpfen. Zu diesem Zweck besitzt der Organismus verschiedene Abwehrmechanismen, die in angeborene oder unspezifische und erworbene oder spezifische Immunabwehr eingeteilt werden können (Eisenbarth and Flavell, 2009).

4.1.1 Angeborene oder unspezifische Immunabwehr

Zu der angeborenen Immunabwehr zählen zunächst die äußeren Grenzflächen des Organismus. Diese haben unspezifische physikalische, wie auch chemische Schutzmechanismen. Demzufolge ist die erste Barriere für Mikroorganismen das Epithelgewebe der Haut und der Schleimhäute. Bei unverletztem Epithelgewebe ist es fast unmöglich, dass Keime in den Körper eindringen können, da die Haut und die Schleimhäute ein geschlossenes System bilden und zum anderen der pH-Wert der Haut bei 3 – 5 liegt. Dies stellt für viele Keime kein geeignetes Milieu zur Vermehrung dar. Aber auch der Bronchialschleim und Flimmerepitheltransport, das saure Magensekret und der Flüssigkeitstransport der Harnwege wirken den eingedrungenen Pathogenen in den entsprechenden Organen entgegen.

Da Pathogene auch durch Verletzungen in den Körper eindringen können, besitzt der Organismus zusätzliche innere Schutzmechanismen. Eindringene Pathogene lösen eine Entzündungsreaktion aus, wobei viele Mechanismen ineinandergreifen. Im Bereich der Verletzung bzw. im Bereich, indem die Pathogene eingedrungen sind, werden Entzündungsmediatoren von geschädigten Fibroblasten oder ortsständigen Gewebemakrophagen ausgeschüttet. Dadurch werden Phagozyten (neutrophile

Granulozyten und Makrophagen, die aus Monozyten hervorgehen) chemotaktisch angelockt. Dann werden die Fremdkörper, aber auch abgestorbene Zellen von diesen eliminiert, indem sie sie phagozytieren oder mittels Lysozymen, Oxidantien (Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikale) und Stickstoffmonoxid schädigen und anschließend mit Hilfe von Lysozymen verdauen. Sind allerdings die Pathogene zu groß, um phagozytiert zu werden, können diese auch mit Hilfe von Proteasen und zytotoxischen Proteinen lysiert werden. Allerdings müssen die Fremdkörper erst einmal von den Phagozyten erkannt werden. Deshalb werden die Fremdkörper von Komplementfaktoren und Antikörpern gebunden (Opsonierung) und erleichtern somit die Erkennung und die Phagozytose. Nach Aufnahme der Pathogene werden diese in sogenannten Phagolysosomen abgebaut.

Neben den Phagozyten gibt es noch die natürlichen Killerzellen (natural killer cells, NKs), als zelluläre Komponente der angeborenen Immunabwehr, die vor allem Zellen, die mit Viren oder Mykobakterien infiziert sind, und Tumorzellen bekämpfen. Die NKs besitzen die Fähigkeit, infizierte Zellen und Tumorzellen anhand ihrer natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (NCR – NKp30, NKp44 und NKp46) oder Killerzellen Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR) und über Antikörper, die die infizierten Zellen opsonieren als „fremd“ zu erkennen (Vivier et al., 2011). Dadurch können die NKs über ihren kristallisierbaren Fragment Rezeptor (Fc-Rezeptor; crystallizable fragment) die Antikörper binden. Nach Ausbildung dieser Bindung sezernieren die NKs Proteine, die sogenannten Perforine, die die Plasmamembran permeabilisieren, indem sie Poren bilden. Der genaue Mechanismus, wie es zur Apoptose der Zelle kommt, ist bis heute noch ungeklärt. Dieser Vorgang wird auch als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) bezeichnet (Biburger et al., 2012). NK werden durch Interferone (IFN- α und IFN- β), die entweder von Leukozyten und Fibroblasten oder von den NK selbst ausgeschüttet werden, aktiviert.

Einen wesentlichen Anteil am angeborenen Immunsystem hat das Komplementsystem, es besteht aus ca. 20 Proteinen, wovon einige durch Peptidspaltung aktiviert werden. Man unterscheidet zwei Aktivierungswege, zum einen der klassische Weg über Antigen-Antikörper-Komplexe und zum anderen der alternative Weg über Erkennung bzw. Bindung der Bakterienpolysaccharide. Die Wirkungsweise der Komplementfaktoren ist vielfältig. Sie können sich mit anderen Proteinen an der

Oberfläche von Pathogenen binden (Opsonierung → Komplementfaktor C3b), sie können sich zusammenlagern und Poren in die Zellmembran bilden (lytischer Komplex → Komplementfaktoren C5b – C9), sie können auch als chemotaktische Faktoren (Komplementfaktoren C5a) wirken oder sie können Mastzellen aktivieren, die daraufhin Entzündungsmediatoren sezernieren.

4.1.2 Erworbene oder spezifische Immunabwehr

Zu der erworbenen Immunabwehr zählen alle Mechanismen, die nach dem ersten Kontakt mit einem Pathogen ein spezifisches Abwehrsystem entwickeln (immunologisches Gedächtnis), um bei einem erneuten Kontakt schneller und effektiver wirken zu können (Immunität). Dazu zählt vor allem die Abwehr mit Hilfe der T-Lymphozyten und der B-Lymphozyten (Abb. 1).

Zu den T-Lymphozyten gehören die zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic T-cells, CTLs) und die T-Helferzellen und die regulatorischen T-Zellen (Andersen et al., 2006). Die CTLs erkennen spezifisch Teile (Epitope) körperfremder Substanzen der Zelle und eliminieren sie. Im Gegensatz dazu aktivieren T-Helferzellen Makrophagen, die die B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren und setzen Zytokine frei. Dadurch sind T-Helferzellen nur indirekt an der Eliminierung bzw. der Bekämpfung der Pathogene beteiligt. B-Zellen erkennen ebenfalls Epitope spezifisch und bilden nach einem Kontakt spezifische Antikörper gegen diese und setzen sie frei, so dass die Fremdkörper opsonisiert werden können. Die opsonisierten Fremdkörper werden mit Hilfe von Phagozyten eliminiert.

Die T- und B-Lymphozyten entwickeln bei der Reifung der Lymphozyten von naiven zu Effektorzellen Fähigkeiten, um körperfremde Antigen spezifisch erkennen zu können. Aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gehen zunächst die lymphatischen Vorläuferzellen hervor. Diese können entweder im Knochenmark (B-Zellen) verbleiben oder gelangen über das Blutssystem und über das lymphatische System zum Thymus (T-Zellen). Hier werden zunächst Lymphozyten gegen körpereigene Antigene eliminiert. Die übrigen B- und T-Lymphozyten reifen weiter heran, um schließlich über die sekundären lymphatischen Organe und die Blutbahn den Körper nach spezifischen Antigene oder entarteten Zellen zu durchsuchen (Gowans and Knight, 1964).

Das Antigen wird mittels der Hilfe von sogenannten „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen (antigen-presenting cells, APCs), dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen, der T-Zelle präsentiert. Die APCs nehmen den Fremdkörper auf, der dann so prozessiert wird, dass nur ein kleines Peptidfragment zusammen mit einem Proteinkomplex, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex) oder kurz MHC zur Zelloberfläche transloziert wird (Zinkernagel and Doherty, 1974; Bjorkman et al., 1987). Somit wird ein Teil des Fremdkörpers den T- und B-Zellen zugänglich gemacht, damit diese ihre Funktion aufnehmen können um die infizierte Zelle oder den Fremdkörper inaktivieren bzw. eliminieren zu können.

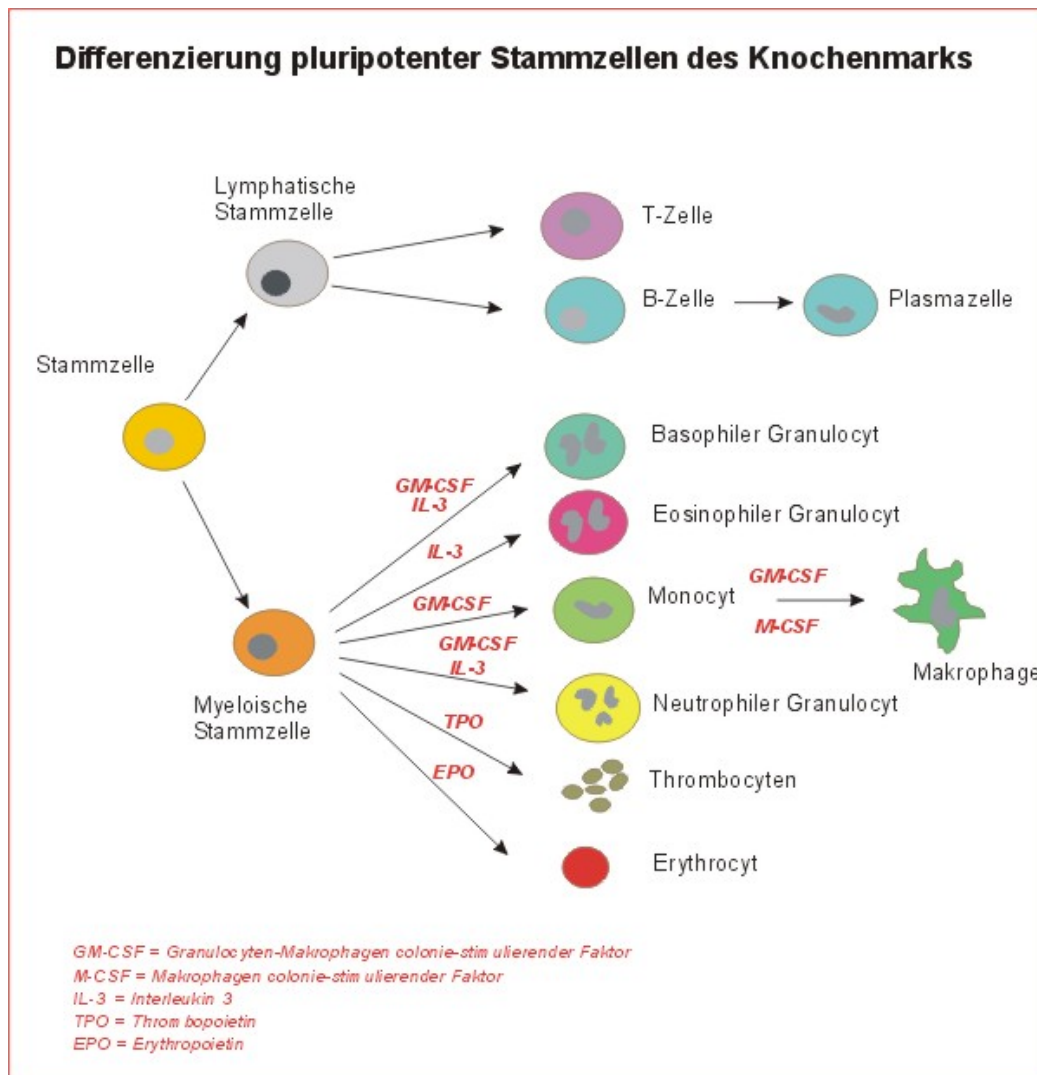


Abb. 1: Differenzierung pluripotenter Stammzellen des Knochenmarks

Aus pluripotenten Stammzellen differenzieren sich zwei Stammzellen, zum einen die lymphatischen Stammzellen und zum anderen die myeloischen Stammzellen. Aus den lymphatischen Stammzellen gehen die B- und T-Lymphozyten hervor. Aus den myeloischen Stammzellen differenzieren sich die Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten (Quelle: http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/immunantwort.html).

4.2 Zytotoxische T-Lymphozyten

Wie bereits schon erwähnt, stammen die CTLs von lymphatischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Diese Vorläuferzellen gelangen über das lymphatische System und über die Blutbahn zum Thymus, in dem die Reifung der T-Lymphozyten statt findet (Goldschneider et al., 1986). Im Thymus werden die Vorläuferzellen als T-Vorläuferzellen bezeichnet und differenzieren sich zu sogenannten doppelt

„negativen“ T-Lymphozyten. Dies bedeutet, dass sie weder das Signalmolekül CD4 noch CD8 (cluster of differentiation, CD) auf der Oberfläche tragen. Durch einen weiteren Differenzierungsprozess werden sowohl der T-Zell-Rezeptor als auch die beiden Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 exprimiert. In diesem Stadium werden die Zellen als doppelt „positive“ T-Zelle bezeichnet. Im Verlauf der Reifung überleben nur die T-Zellen, die die körpereigenen MHC-Moleküle erkennen. Alle anderen Zellen werden durch Apoptose eliminiert (positive Selektion). Dieser Prozess wird auch als Induktion der MHC-Restriktion bezeichnet. Danach verlieren die T-Lymphozyten ein Signalmolekül, entweder das CD4- oder CD8-Molekül, und werden nun als CD4-positiv oder CD8-positiv bezeichnet. In diesem Reifestadium werden diejenigen T-Lymphozyten, die körpereigene Antigene (Autoantigene) erkennen, eliminiert (negative Selektion) und der Reifungsprozess ist damit abgeschlossen. Die geprägten T-Lymphozyten verlassen den Thymus als reife naive T-Zelle und zirkulieren im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen auf der Suche nach dem Antigen, für das sie im Reifungsprozess spezialisiert wurden (Houston et al., 2012).

Damit die CTLs die APCs über das Antigen binden können, besitzen diese einen spezifischen Rezeptor, den T-Zell Rezeptor (T-cell receptor; TCR). Der TCR besteht aus zwei Untereinheiten (entweder α/β oder γ/δ), wobei diese Untereinheiten wiederum aus zwei Domänen bestehen. Die konstanten Domänen sind mit dem N-Terminus an der Plasmamembran verankert und sind ihrerseits mit einer Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die variablen Domänen besitzen die Bindungsstellen für das Antigen. Dadurch ist der TCR strukturell dem antigenbindenden Fragment (antigen binding fragment, Fab) eines Antikörpers sehr ähnlich. Darüber hinaus interagieren zwei CD3-Moleküle, die für die Signalweiterleitung verantwortlich sind mit dem TCR. Dieser Komplex wird als TCR-Komplex bezeichnet. Weiterhin binden die CD8-Moleküle an die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche der APCs und dienen der Stabilisierung des Kontaktes zwischen der CTLs und der APCs.

Nachdem die CTLs das Antigen erkannt haben, erfolgt eine Signalweiterleitung über die CD3-Moleküle in das Zellinnere. Das Signal wird durch kostimulatorische Signale verstärkt. Als kostimulatorische Proteine sind CD28, zytotoxisches T-Lymphozyt Antigen 4 (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) und Leukozyten Funktionsantigen (LFA-1, leucocyte function associated antigen 1) bekannt (Davignon et al.,

1981). Durch die Kostimulation wird in der CTL eine Bildung und Freisetzung von Interleukin 2 (IL-2) herbeigeführt, die für die Proliferation und Differenzierung zur CTL-Effektorzelle verantwortlich ist (Boyman and Sprent, 2012). Fehlt dieses Signal, kann die CTL wieder inaktiviert werden (Anergie), wobei sie selbst durch eine weitere Stimulation durch eine APC nicht wieder aktiviert werden kann. Dieser Mechanismus dient der Vermeidung von Autoimmunreaktionen, da die CTLs inaktiviert wird, die mit ihrem TCR mit körpereigenen Strukturen interagiert.

4.3 Die immunologische Synapse

Als immunologische Synapse (IS) oder supramolekularer Adhäsionskomplex (supramolecular adhesion complex, SMAC), wird die Kontaktzone zwischen T-Zelle und APC bezeichnet (Norcross, 1984; Paul et al., 1987; Dustin and Colman, 2001). Da die Bildung der immunologischen Synapse ein dynamischer Prozess ist, wie auch die Kontaktzone unterschiedliche Funktionen ausführen kann, können verschiedene Formen an Synapsen gebildet werden. So kann man folgende Synapsen voneinander unterscheiden: Monozentrische oder stabile Synapse, sekretorische Synapse, multizentrische Synapse, nicht-sezernierende Synapse und die dynamische Synapse (Friedl et al., 2005). Im Folgenden wird nur die sekretorische Synapse näher betrachtet, da diese Synapse im Rahmen des Abtötens der APC durch die CTL mittels zytotoxischen Granulen vermittelten Signalweg eine Rolle spielt (Bossi et al., 2002; Podack et al., 1988). Die sekretorische IS ist nach einem bestimmten Schema aufgebaut und besteht aus drei Bereichen, die cSMAC (centre SMAC), pSMAC (peripheral SMAC) und dSMAC (distal SMAC) (Abb. 2) (Monks et al., 1998). Im cSMAC befinden sich die folgenden Proteine: TCR, CD8, das kostimulatorische Molekül CD28, PKC- θ (Proteinkinase C θ), LAT (Linker of activated T-cells) und AKT (oder Proteinkinase B; PKB). Außerdem sind das Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC; microtubule-organizing centre), polymerisiertes Tubulin und neu rekrutierte Granulen im cSMAC lokalisiert. In dieser Region werden auch die sekretorischen Vesikel, die sowohl Granzyme und Perforin als auch Proteoglykane und andere lysosomale Proteine enthalten, sezerniert. Während im peripheren Bereich, im pSMAC Talin, LFA1, CD2 und CD11a

angereichert sind (Bromley et al., 2001; Huppa and Davis, 2003). Im dSMAC sind die Oberflächenmoleküle CD43, CD44 und CD45 angesiedelt.

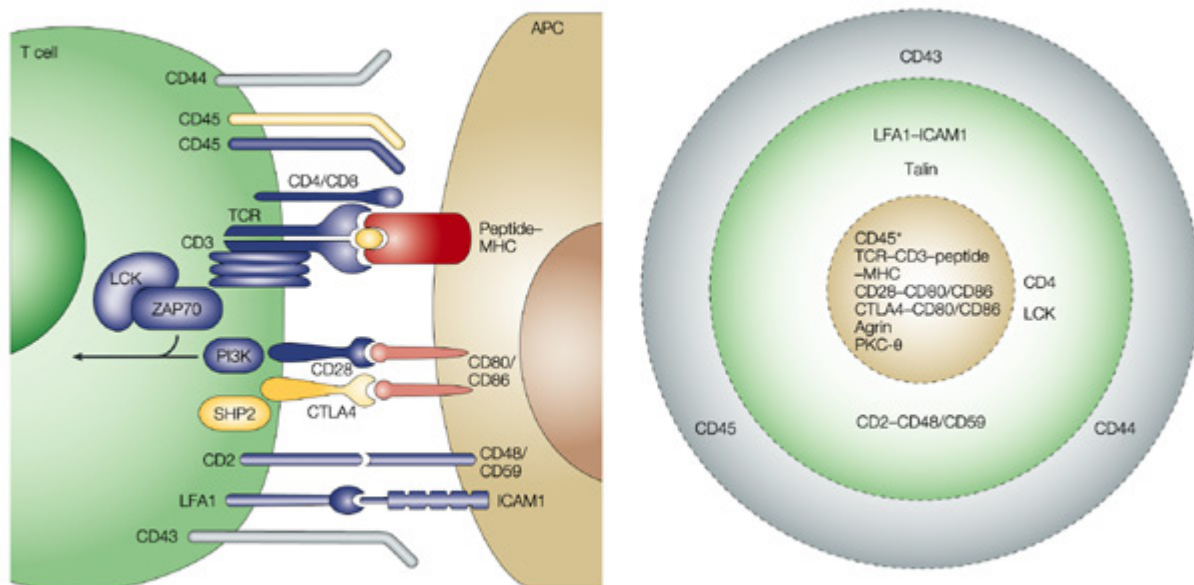


Abb. 2: Molekularer Aufbau der Immunologischen Synapse.

Die IS kann in drei Bereiche eingeteilt werden. Das Zentrum entspricht dem cSMAC, dieser umfasst den CD8-TCR-CD3-Peptid-MHC-Komplex, die kostimulatorischen Proteine wie CD28-CD80/CD86, CTLA4-CD80/CD86 und die Proteine CD45, Agrin und PKC- θ in der CTL. Um den cSMAC schließt sich der pSMAC an. In diesem sind die CD2-CD48/CD59-Komplex, LFA-1-ICAM-1-Komplex, sowie LCK und Talin in der Effektorzelle. Um den pSMAC ist der dSMAC lokalisiert, dieser schließt die Proteine CD45, CD44 und CD43 ein (Quelle: Huppa and Davis, 2003).

4.4 Signaltransduktion in T-Lymphozyten

Nach Ausbildung des MHC-Antigen-Komplexes kommt es zu einer intrazellulären Signaltransduktion in der T-Zelle, gefolgt durch eine IS-Bildung (Abb. 3). Der TCR triggert die Relokalisation der SRC-Familie Kinase LCK (lymphocyte specific protein tyrosine kinase) in cholesterinreiche Mikrodomänen in der Zellmembran (lipid rafts) (Viola et al., 1999). LCK wird durch Autophosphorylierung aktiviert und wird zudem von kostimulatorischen Signalen, wie z.B. über CD28 vermittelte Signale, verstärkt aktiviert (Kuiper et al., 1994). Die aktivierte LCK wiederum aktiviert SRC-Familie Kinase FYN durch Tyrosinphosphorylierung. Die aktivierten Kinasen LCK und FYN phosphorylieren Proteine, die eine sogenannte Immunorezeptor tyrosinbasierender

Aktivationsmotive (ITAMs; immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) besitzen, wie die ζ -Kette des CD3 und ZAP70 (ζ -Kette assoziierte Proteinkinase von 70 kDa) (Gauen et al., 1994; Straus and Weiss, 1992). ZAP70 aktiviert LAT (linker for activation of T cells), ein Adapterprotein, das in der Plasmamembran integriert ist. Von diesem Protein wird das Signal auf verschiedene andere Proteine übertragen. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem die Phospholipase C- γ (PLC- γ), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und SLP76 (SRC-homology-2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) (Samelson, 2002). Die PLC- γ spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂ oder Ptdins(4,5)P₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃ oder InsP₃) und Diacylglycerol (DAG). DAG aktiviert die Proteinkinase C- θ (PKC- θ), die für die Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktor κ B (NF- κ B; transcription factors nuclear κ B) und des Aktivatorprotein 1 (AP1) verantwortlich ist (Kong et al., 2011). Dagegen ist IP₃ ein wichtiger Messenger für die intrazellulären Kalziumsignale. IP₃ bindet am IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER), das unter anderem als intrazellulärer Kalziumspeicher dient (Crabtree and Clipstone, 1994). Durch die Aktivierung des Rezeptors wird eine Kalziumfreisetzung aus dem ER induziert. Diese Freisetzung hat die Aktivierung des CRAC-Kanals (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺) mit Hilfe der Interaktion von STIM1 (stromal interaction molecule) zur Folge (McNally et al., 2012). Die CRAC-Kanäle sind in der Plasmamembran integriert und nehmen somit Kalzium von außen auf (Prakriya, 2009). Dadurch kommt es zu einem intrazellulären Kalziumkonzentrationsanstieg, der sowohl die kalziumabhängige Kaliumkanäle (KCa) als auch die Ca²⁺-ATPase in der Plasmamembran (PMCA) aktiviert (Feske et al., 2001). Der Konzentrationsanstieg hat aber auch eine hemmende Funktion der CRAC-Kanäle zur Folge. Für die Exozytose der sekretorischen Granula ist es essenziell, dass die erhöhte Kalziumkonzentration erhalten bleibt, deshalb muß die Inhibition der CRAC-Kanäle unterbunden werden. Dies geschieht durch die lokale Kalziumaufnahme über einen Uniporter der Mitochondrien, so dass die zytosolische Kalziumkonzentration erhalten bleibt, aber die lokale Kalziumkonzentration in Nähe der CRAC-Kanäle reduziert wird (Hoth et al., 1997; Lewis, 2001). Erst im weiteren Verlauf wird das Kalzium über Na⁺/Ca²⁺-Austauscher an das Zytosol abgegeben, wovon es über SERCA-Pumpen (sarco-endoplasmatic-reticulum Ca²⁺-ATPase) in das ER aufgenommen wird.

PI3K phosphoryliert PIP₂, wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃ oder Ptdins(3,4,5)P₃) gebildet wird, welches mit den Proteine AKT und WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin homologous protein) interagiert. Durch AKT, WAVE und SLP76 wird die Struktur und Dynamik von Aktin im zentralen Bereich (cSMAC) der IS moduliert (Stradal et al., 2004). Im Gegensatz dazu interagiert Talin mit LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) und ICAM1 (intracellular adhesion molecule 1) im peripheren Bereich (pSMAC), wodurch eine Verbindung zum Aktinzytoskelett erreicht wird (Lebedeva et al., 2004). Eine Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM1 wird durch RHO (Ras homolog)-family GTPase RAP1 induziert, indem die Aktinfilamente verstärkt werden. Aktinfilamente, Mikrotubuli und das Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC; microtubule-organizing centre) bewegen sich zur IS und formen dadurch ein Gerüst für den Vesikeltransport (Kuhn and Poenie, 2002; Stinchcombe et al., 2006).

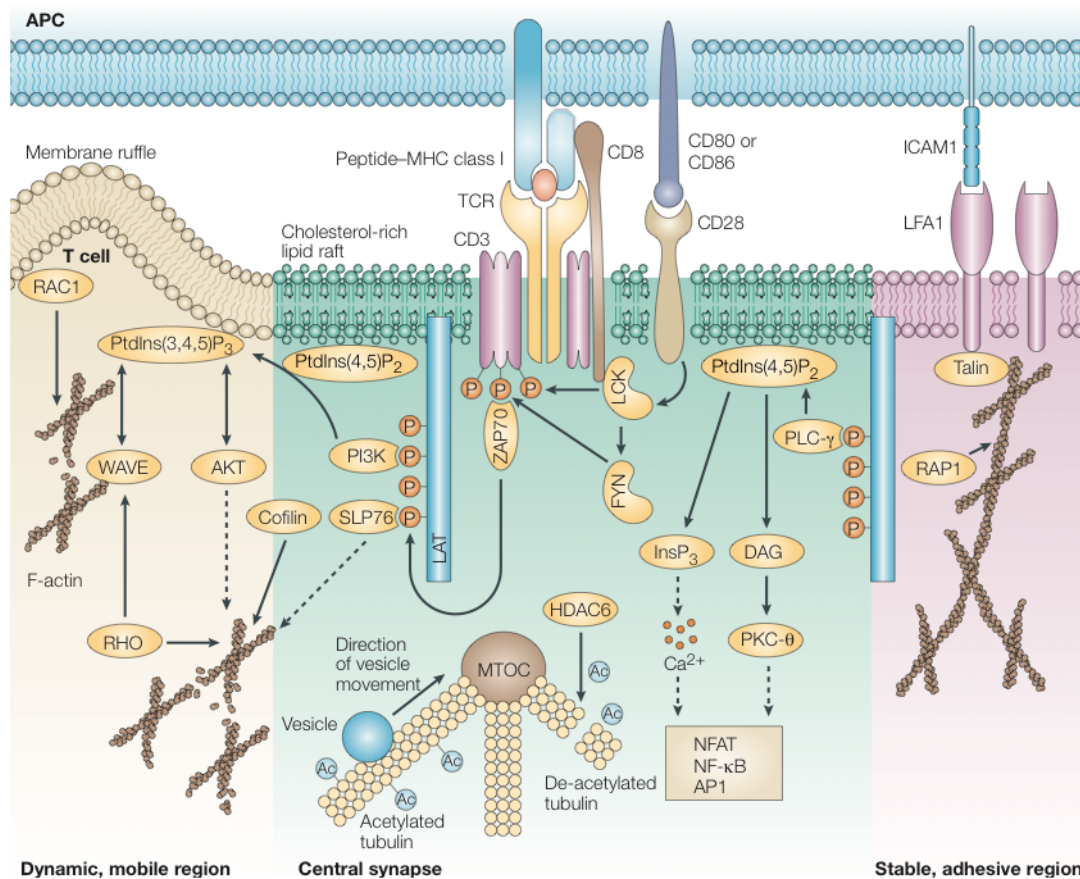


Abb. 3: Model der IS und Signaltransduktion in der CTL.

Die Bindung des MHC/Antigen-Komplexes an den TCR führt zur Induktion einer Signalkaskade. Durch Phosphorylierung der ITAM-Motive des CD3 und des ZAP70 führen zur Aktivierung dieser Proteine. ZAP70 phosphoryliert LAT und dieses aktiviert die PLC- γ , PI3K und SLP76. PLC- γ spaltet PIP₂ in IP₃ und DAG. IP₃ ist für die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern verantwortlich. DAG dagegen aktiviert die PKC- θ . Kalzium wie auch die PKC- θ aktivieren Transkriptionsfaktoren, wie NFAT, NF- κ B und AP1. Durch Phosphorylierung von PIP₂ entsteht IP₃, das wiederum verschiedene Zielproteine wie WAVE, AKT aktiviert. Durch die kostimulatorische Aktivierung von CD28 werden die SRC-Familien Kinase LCK und FYN aktiviert. Beide Kinasen phosphorylieren CD3 (Quelle: modifiziert aus Tuning Immune Responses: Diversity and Adaptation of the Immunological Synapse, Friedl et al., 2005).

4.5 Zytotoxizität

Die CTLs haben verschiedene Möglichkeiten APCs abzutöten. Zum einen können sie nach Bildung einer stabilen Immunologischen Synapse die APCs über den lytischen Granulen vermittelten Signalweg oder Perforin/Granzym Signalweg und zum anderen über den Fas/Fas-Ligand Signalweg abtöten (Jenkins and Griffiths, 2010; Kojima et al., 1994; Lowin et al., 1994).

4.5.1 Perforin/Granzym Signalweg

Lytische Granulen sind Lysosome, die sowohl lysosomale als auch sekretorische Proteine enthalten (Trapani, 2012). Lysosomale Proteine kommen in nahezu allen Zellen vor und hydrolysieren Makromoleküle. Zu ihnen zählen Proteasen, Lipasen und Glykosidasen. Des Weiteren sind aber auch membranassoziierte Proteine gefunden worden, wie Lamp-1 (CD107a), Lamp-2 (CD107b), Lamp-3 (CD63) und verschiedene Cathepsine. Die Funktion dieser Proteine ist noch teilweise unklar.

Die sekretorischen Proteine werden nach einem Stimulus sezerniert. In CTLs sind die wichtigsten sekretorischen Proteine Perforin und Granzyme. Perforin bildet durch Zusammenlagerung mehrerer Moleküle Poren in der Zielmembran der APCs, wodurch extrazelluläres Medium, insbesondere Kalziumionen, in die Zelle gelangen und eine Nekrose auslösen (Lieberman, 2003; Voskoboinik, 2010; Zhou, 2010). Granzyme sind Serinproteasen, die verschiedene Proteine hydrolysieren und somit eine Apoptose in der Zielzelle auslösen können (Bots and Medema, 2006). Beide Proteinarten können den Zelltod induzieren und werden deshalb als lytische Proteine bezeichnet (Lowin et al., 1995).

Perforin und die Granzyme werden als „precursor“ Proteine synthetisiert und werden im trans-Golgi Netzwerk in Vesikel verpackt. Bisher ist die Biosynthese und Reifung der sekretorischen Lysosomen noch nicht ganz verstanden. Initiale Lysosomen sind klein und besitzen multivesikuläre Einschlüsse. Über die Zeit vergrößern sie sich und die Anzahl der Einschlüsse steigt. In einem noch späteren Stadium entsteht ein dichter Kern (dense core). Während dieses Reifungsprozesses der Lysosomen durchlaufen auch die sekretorischen Proteine einen Reifungsprozess (Griffiths and Argon, 1995; de Saint Basile et al., 2010). Die sekretorischen Proteine Perforin und Granzyme besitzen am N-Terminus ein Signalpeptid mit 21 Aminosäuren und können somit in unreife spezialisierte sekretorische Granulen sortiert werden. Das Milieu ist sauer und beinhaltet sowohl lysosomale als auch sekretorische Proteine. Während der Reifung werden die Proteine noch prozessiert; so wird am C-Terminus ein Peptid entfernt, wodurch das Protein aktiv wird. Allerdings sind die Proteine im sauren Milieu inaktiv und gleichzeitig werden sie dadurch stabilisiert. Außerdem lagern sich inhibitorische Proteine, wie z.B. Serglyzin und Calretikulin an (Kolset and Tveit, 2008).

Nach Bindung des Liganden an den TCR wird die CTL zur Exozytose stimuliert. Der genaue Stimulationsprozess der zur Degranulation führt, ist bisher nicht völlig

aufgeklärt. Aber bekannt ist, dass es zu einem Kalziumanstieg kommt, was zur Mobilisierung der lytischen Granulen führt (Lyubchenko et al., 2001). Die lytischen Granulen werden entlang der Mikrotubuli, die vom MTOC ausgehend mittels Kinesine (Transportprotein) zur IS transportiert (Kurowska et al., 2012). An der IS angekommen docken zunächst die Granulen an die Plasmamembran und werden durch den Primingprozess fusionskompetent gemacht. Mit Hilfe von SNARE-(soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor accessory-protein (SNAP) receptor) Proteine, die im nächsten Kapitel genauer betrachtet werden, werden die lytischen Granulen an der Plasmamembran verankert und an diese herangezogen, so dass beide Membranen miteinander fusionieren können (Stow et al., 2006). Dadurch gelangt der Inhalt der Vesikel, wie z.B. die lytischen Proteine in den synaptischen Raum. Durch die Zusammenlagerung mehrerer Perforinmoleküle bilden diese Poren in der Zielmembran. Anschließend erfolgt das Eindringen der Granzyme in die Zielzelle, was, wie in diesem Kapitel bereits beschrieben, zur Nekrose und Apoptose der Zielzelle führt.

4.5.1.1 Sekretion der Lysosomen mit Hilfe von SNAREs und regulatorischen Proteine

Die sekretorischen Granulen werden mittels regulierter Exozytose sezerniert (Logan et al., 2003; Rizo and Rosenmund, 2008). Der Prozess der Exozytose ist sehr ausführlich an neuronalen Zellen untersucht worden. Als bevorzugtes Modellsystem wurden Chromaffinzellen aus dem Nebennierenmark verwendet. Diese Zellen sezernieren Katecholamine, Adrenalin und Noradrenalin, nach einem Stimulus. Der physiologische Stimulus wird durch den Sympathikus, der bei Streß, Flucht- und Kampfreaktionen aktiviert wird, ausgelöst. Der Mechanismus der Exozytose kann mittels Kapazitätsmessungen und Amperometrie analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind. Zu diesen Proteinen zählen die SNARE Proteine, die sowohl an den Granulen wie auch an der Zielmembran verankert sind (Fasshauer, 2003; Jahn and Scheller, 2006; Südhof and Rothman, 2009; Stow et al., 2006). Durch die Interaktion dieser Proteine werden die Granulen an die Membran transloziert und für die Fusion mit der Plasmamembran vorbereitet (Chen and Schneller, 2001). Da die Membran der lytischen Granulen mit

der Plasmamembran verschmilzt, wird der Inhalt der Granulen in den synaptischen Spalt im Fall von Neuronen und extrazellulär im Fall der Chromaffinzellen freigesetzt. Die SNARE-Proteine können nach ihrem Verankerungsort, d.h. entweder an der Vesikel- oder an der Plasmamembran, eingeteilt werden. Sie werden dementsprechend als v-SNAREs (Vesikel) oder als t-SNAREs (target; Zielmembran) bezeichnet. Zu den v-SNAREs gehören die Familie der Synaptobrevine oder VAMPs (vesicle-associated membrane protein) und zu den t-SNAREs zählen vor allem die Syntaxine und SNAP25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa).

Eine neuere Kategorisierung basiert auf der Struktur der SNARE Proteine. Diese besitzen ein funktionelles Motiv, das eine 60 Aminosäuren α -helikale Domäne umfasst. Die Interaktion der SNARE-Proteine wird durch das zentrale coiled-coil SNARE-Motiv vermittelt. So besitzen die R-SNAREs ein Arginin (R) und die Q-SNAREs ein Glutamin (Q) im Zentrum ihrer SNARE-Motive. R-SNAREs sind Proteine, die aus einem einzelnen SNARE-Motiv einer Transmembranpolypeptidkette bestehen. Die Q-SNAREs können weiter unterteilt werden in Qa-, Qb-, Qc- (ein SNARE-Motiv) oder Qb,c- (zwei SNARE-Motive) SNARE-Proteine (Hong, 2005; Fasshauer, 2003; Pattu et al., 2012)

Tabelle 1: Q- und R-SNARE Proteine in Blutzellen

Q- und R-SNARE Familien	
Qa	Syntaxin 1 (STX1), STX2, STX3, STX4, STX5, STX7, STX11, STX13, STX16, STX17 und STX18
Qb	GS27 (Golgi SNARE of 27 kDa), GS28, Vti1a (vesicle transport through interaction with the t-SNARE homologue 1a) und Vti1b
Qc	STX6, STX8 und STX10, GS15, BET1 und SLT1 (SNARE-like tail-anchored protein 1)
Qb,c	SNAP23, SNAP25, SNAP29 und SNAP47
R	VAMP1 (vesicle-associated membrane protein1), VAMP2, VAMP3, VAMP4, VAMP5, VAMP7, VAMP8, ERS24 (SEC22b) und YKT6
Nicht-klassifiziert	D12, SEC20, SEC22a und SEC22c

Die heutige Vorstellung der lytischen Granulensekretion beruht auf Hypothesen (Abb. 4) (de Saint Basile, 2010). Die lytischen Granulen werden zur Plasmamembran transportiert und docken an diese an. Dabei interagieren Rab27a und SLP1 oder SLP2 und die lytischen Granulen mit Munc18-2 und Syntaxin11. Durch Interaktion von Munc13-4 mit dem bereits bestehenden SNARE-Komplex werden die Vesikel geprimt. Somit sind die Vesikel fusionskompetent, d. h. die Vesikel können sezerniert werden (Luzio et al., 2007; Stow et al., 2006; Pattu et al., 2012).

In Immunzellen ist es ganz besonders wichtig, dass die Exozytose erst durch Aktivierung der Zelle erfolgt, aber im Ruhezustand (resting cells) die Vesikel nicht sezerniert werden. Dafür sind verschiedene Mechanismen erforderlich. Zum einem sind das posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen der Q-SNAREs, die entweder zum an- oder abschalten der SNARE-Proteine führen. Dies ist vor allem in Mastzellen gut untersucht worden. So wird das Qa-SNARE-Protein

Syntaxin4 durch Phosphorylierung einer Rab3D assoziierten Kinase inaktiviert (Pombo et al., 2001). Im Gegensatz dazu wird das Qb,c-SNARE-Protein SNAP23 durch Zellaktivierung phosphoryliert und wird dadurch aktiviert (Hepp et al., 2005). Aber auch durch Bindung von regulatorischen Proteinen kann die Konformation der SNARE-Proteine verändert werden. Mitglieder der Sec/Munc-ähnliche Proteine binden an das N-terminale Ende von Syntaxin und regulieren somit die Konformationsänderung der Qa-SNAREs zur Bildung des trans-SNARE-Komplexes. Des Weiteren kann durch Relokalisation cholesterinreiche Mikrodomänen in der Zellmembran die Interaktionen zwischen den Q-SNARE-Proteine und den Sec/Munc-ähnlichen Proteine beeinflusst werden, indem sie diese von einander trennen. Es gibt noch eine Vielzahl von Proteinen, die durch Bindung an SNARE-Proteine eine regulatorische Funktion ausüben. Diese variieren von Zelltyp zu Zelltyp und haben spezifische Funktionen je nach Zelltyp. In neuronalen Zellen und CTLs spielen beispielsweise Synaptotagmin als Kalziumsensor und Tomosyn in neuronalen Zellen eine wichtige Rolle (Fowler et al., 2007)

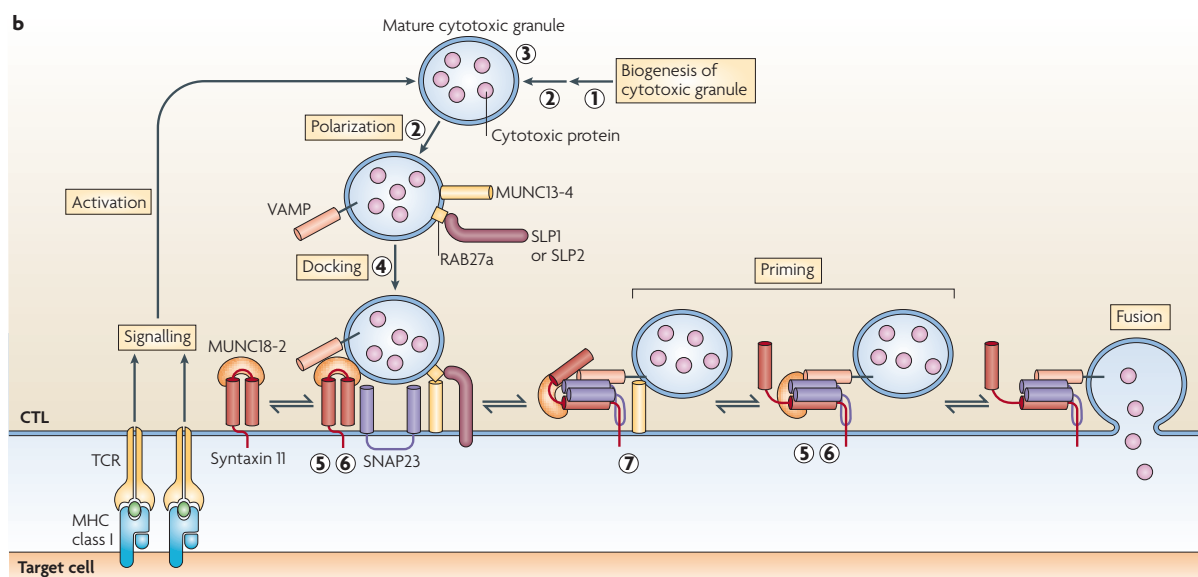


Abb. 4: Model der Exozytose von zytotoxischen Granulen.

Nach Ausbildung der IS werden zytotoxische Granulen (1 + 2) neu synthetisiert und die reifen lytischen Granulen (3) werden zur IS transportiert. Die lytischen Granulen docken an der Plasmamembran an (4), indem Rab27a mit SLP1 oder SLP2 interagiert. Außerdem interagieren die lytischen Granulen mit Munc18-2 und Syntaxin11 (geschlossene Konformation) (5 + 6), Daraufhin werden die gedockten Vesikel mit Hilfe von Munc13-4 geprimt, indem vermutlich Munc13-4 die offene Form von Syntaxin11 triggert. Durch diesen Prozess kann der trans-SNARE-Komplex gebildet werden (7). Durch die Abspaltung von Munc18-2 können die SNARE-Proteine den 4 Helixkomplex noch enger aneinanderlagern, wodurch die Fusion eingeleitet werden kann. (Quelle: de Saint Basile et al., 2010)

4.5.1.2 Munc13-Familie

Munc13 Proteine sind homologe Säugetierproteine zu Unc13 aus *C. elegans*, die mit Hilfe eines Mutationsscreenings identifiziert wurden. Bisher wurden 4 Proteine identifiziert, die zur Munc13-Familie gehören: Munc13-1, Munc13-2, Munc13-3 und Munc13-4 (Koch et al., 2000).

Alle vier Munc13 Proteine besitzen zwei C2-Domänen, die an Ca^{2+} /Phospholipide binden und 2 Munc-homologe Domänen (MHD). Darüber hinaus haben Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 eine C1-Domäne, die mit Diazylglycerol (DAG) bzw. Phorbol ester interagiert. Außerdem beinhaltet die Struktur von Munc13-1 und die ubiquitäre Form von Munc13-2 (eine Spleißvariante von Munc13-2) eine zusätzliche C2-Domäne (Abb. 5).

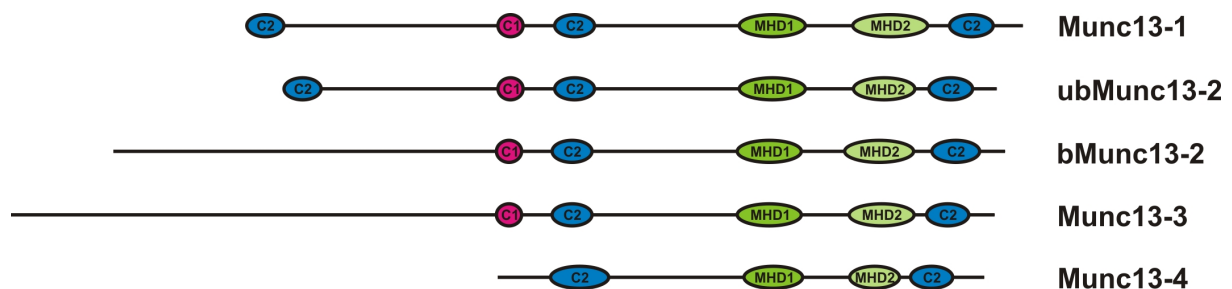


Abb. 5: Strukturen von Munc13 Isoformen

Alle Munc13 Isoformen besitzen zwei C2- und zwei MHD-Domänen. Zusätzlich weisen alle Isoformen, ausgenommen Munc13-4, noch eine C1-Domäne auf. Munc13-1 und ubMunc13-2 zeigen eine weitere C2-Domäne am N-Terminus.

Munc13 Proteine spielen eine wichtige Rolle beim Priming synaptischer Vesikel, so bindet beispielsweise Munc13-1 an Syntaxin und ist damit verantwortlich für die Translokation von Munc18, das an Syntaxin bindet und für die Struktur der SNARE-Proteine eine Rolle spielt (Betz et al., 1997; Richmond et al., 2001).

Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 sind im Gehirn exprimiert, wobei aber die verschiedenen Proteine sehr unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (Augustin et al., 1999).

So kommt Munc13-1 in allen Neuronen des Zentralnervensystems vor und ist bei der Neurotransmitterausschüttung von den meisten glutamatergen Synapsen (90%) beteiligt (Augustin et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass bei Verlust von Munc13-1 in Deletionsmutanten in Mäusen der synaptische Vesikelzyklus in

hippocampalen Neuronen gehemmt wird. Dabei war die Anzahl der gedockten Vesikel, die noch nicht gepriemt waren, normal, konnten aber nach einem physiologischen Stimulus nicht mit der Plasmamembran fusionieren (Augustin et al., 1999). Somit war der Beweis erbracht, dass Munc13-1 eine essenzielle Rolle beim Priming von synaptischen Vesikeln spielt (Varoqueaux et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von Munc13-1 in Chromaffinzellen und an der neuromuskulären Endplatte von *Xenopus* die Fusionsrate stark erhöht war (Ashery et al., 2000; Betz et al., 1998).

Außerdem ist nach neuesten Studien Munc13-1 nicht nur im Gehirn exprimiert, sondern auch in Inselzellen des Pankreas und könnte bei der Sekretion von Insulin beteiligt sein (Kwan et al., 2006).

Dahingegen ist Munc13-2 im rostralen Bereich des Gehirns, wobei der zerebrale Cortex und das Ammonshorn (cornu ammonis) des Hippocampus eingeschlossen sind, exprimiert. Die Funktion von Munc13-2 ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Aber es gibt bereits Hinweise, dass Munc13-2 die Funktion des Primings in den restlichen 10% glutamatergen Synapsen und bei den GABAergen bzw. inhibitorischen Synapsen übernimmt (Rosenmund et al., 2002).

Munc13-3 konnte hauptsächlich im Cerebellum nachgewiesen werden und ist die Form, von der am wenigsten bekannt ist. Allerdings konnte schon bewiesen werden, dass bei Plastizitätsvorgängen und bei Lernprozessen im Gehirn Munc13-3 essenziell ist (Augustin et al., 2001).

Da Munc13-1 in allen Neuronen des Zentralnervensystems vorkommt, ist es entweder mit Munc13-2 oder Munc13-3 im Gehirn koexprimiert und dadurch ist gewährleistet, dass Munc13-2/Munc13-3 zumindest partiell redundant die Funktion von Munc13-1 übernehmen können (Varoqueaux et al., 2002).

Munc13-4 konnte in verschiedenen Blutzellen, wie CTLs, NKs, Thrombozyten, Neutrophilen und Mastzellen, sowie in den Becherzellen des Bronchialepitheliums und den Alveolarzellen Typ 2 der Lunge identifiziert werden (Marcenaro et al., 2006; Higashio et al., 2008; Pivot-Pajot et al., 2008; Koch et al., 2000).

Durch Mutation des Munc13-4 Gens können die lytischen Granulen von CTLs und NKs nicht sezerniert werden, was zu einer hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) führt (Feldman et al., 2003). Elstak et al. (2011) identifizierte in FHL 3 (familiäre HLH) Patienten eine Transversionsmutation (2695C>T Mutation) in Exon 28. Diese Mutation führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und dadurch

werden nur die Aminosäuren 1 – 899 kodiert (Munc13-4 1 – 899). Es konnte gezeigt werden, dass das verkürzte Protein translatiert wird und in CD63-positiven sekretorischen Lysosomen lokalisiert ist. Allerdings ist die Stabilität des Proteins reduziert und die Dynamik der Halbwertszeit an der Granulenmembran ist verändert. Des Weiteren sind Proteine bekannt, die unmittelbar durch Bindung an Munc13-4 eine wichtige Rolle bezüglich der Sekretion einnehmen. Durch Mutationen, vor allem Punktmutationen, von Munc13-4 können diese Proteine nicht an Munc13-4 binden. Proteine die an Munc13-4 binden sind Rab27a, SLP-1 und Doc2 (Higashio et al., 2008). Rab27a ist verantwortlich für den Transport der lytischen Granulen zur Membran und SLP-1 könnte eine Rolle bei der Bildung des SNARE-Komplexes spielen (Neeft et al., 2005; van der Sluijs et al., 2008). So konnte Elstak et al. (2011) zeigen, dass Munc13-4 ein Rab27a-Bindemotiv im N-Terminus besitzt und durch eine Punktmutation Rab27a nicht binden kann. Dies führt dazu, dass die sekretorischen Lysosomen an der Plasmamembran nicht fusionieren können und der Rab27a-Munc13-4-Komplex für die Degranulation unerlässlich ist.

Bisher war bekannt, dass genetische Defekte im Munc13-4 Gen und in Rab27a zu Immundefiziten nach viralen und bakteriellen Infektionen führen. Johnson et al. (2011) untersuchten die Neutrophileninfiltration in die Leber in Rab27a- und Munc13-4-defizite Mäuse nach Lipopolysaccharidbehandlung. Rab27a, aber nicht Munc13-4 spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Neutrophilen in die Leber.

4.5.1.3 Genetische Defekte und Erkrankungen des Immunsystems aufgrund beeinträchtigter Exozytose von lytischen Granulen

Die zelluläre Zytotoxizität der CTLs und NKs wird durch die Sekretion der zytotoxischen Proteine Perforin und Granzyme vermittelt. Die Sekretion ist eine gerichtete Freisetzung und wird dementsprechend durch viele Proteine geregelt und reguliert. Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zytotoxizität haben, sind vor allem Perforin und Granzyme, die die eigentlichen zytotoxischen Proteine sind, die Transportproteine Rab27a und LYST, die die lytischen Granulen zur Synapse befördern, Munc13-4, Syntaxin11 und Munc18-4, die die Fusion der lytischen Granulen vermitteln. Fällt die Funktion nur eines dieser Proteine weg, so kommt es zu einer Störung der Zytotoxizität und wird aufgrund ihrer Auswirkung auf

den Organismus auch als Hämophagozytosesyndrom bezeichnet (Stinchcombe et al., 2001; Goransdotter Ericson et al., 2001).

4.5.1.3.1 Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) und familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose (FHL)

Die hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) ist eine seltene Erkrankung, die ohne Behandlung tödlich verläuft. Die HLH ist durch eine überreaktive, aber ineffektive Immunantwort charakterisiert und wird deshalb auch als Hyperinflammationssyndrom bezeichnet. Durch eine Störung der Zytotoxizität von NKs und CTLs kommt es bei Infektionen zu anhaltend hohen Zytokinpiegeln. Dadurch werden Makrophagen bzw. Histiozyten, das sind Gewebsmakrophagen, die durch Zytokine aktiviert und in Makrophagen umgewandelt werden können, und Lymphozyten aktiviert, gefolgt von einer aggressiven Proliferation der aktivierten Zellen (Abb. 6). Durch die übermäßige Anzahl der Makrophagen und Lymphozyten kommt es zu Infiltrationen in Leber, Milz, Knochenmark, Leber, Haut, Rückenmark und Lymphknoten. Außerdem sind die Makrophagen überreaktiv, was zur Folge hat, dass rote und weiße Blutzellen, so wie Thrombozyten von ihnen phagozytiert werden. Sowohl die Infiltration wie auch die Überreaktion der Lymphozyten und der Histiozyten führen zur Schädigung der Organe. Dies wiederum führt zu einer Reihe von unspezifischen Symptomen, die die Diagnose dieser Erkrankung erschwert. Folgende Symptome können auftreten: Fieber ($>38,5^{\circ}\text{C}$ über mehrere Tage), Splenomegalie, Zytopenie (wobei mehrere Zelllinien beteiligt sind), Hypertriglyceridämie, Fibrinogenämie, Hämophagozytose in Knochenmark, Milz oder Lymphknoten, wenige oder keine NKs, erhöhte Ferritinwerte im Serum, erhöhte Werte des löslichen CD25 (sIL-2 Rezeptor). Um die Diagnose zu sichern, wird auf Hämophagozytose der roten oder weißen Blutzellen oder der Thrombozyten im Knochenmark, in der Milz oder der Lymphknoten untersucht (Janka, 2012; Pachlopnik Schmid and de Saint Basile, 2010).

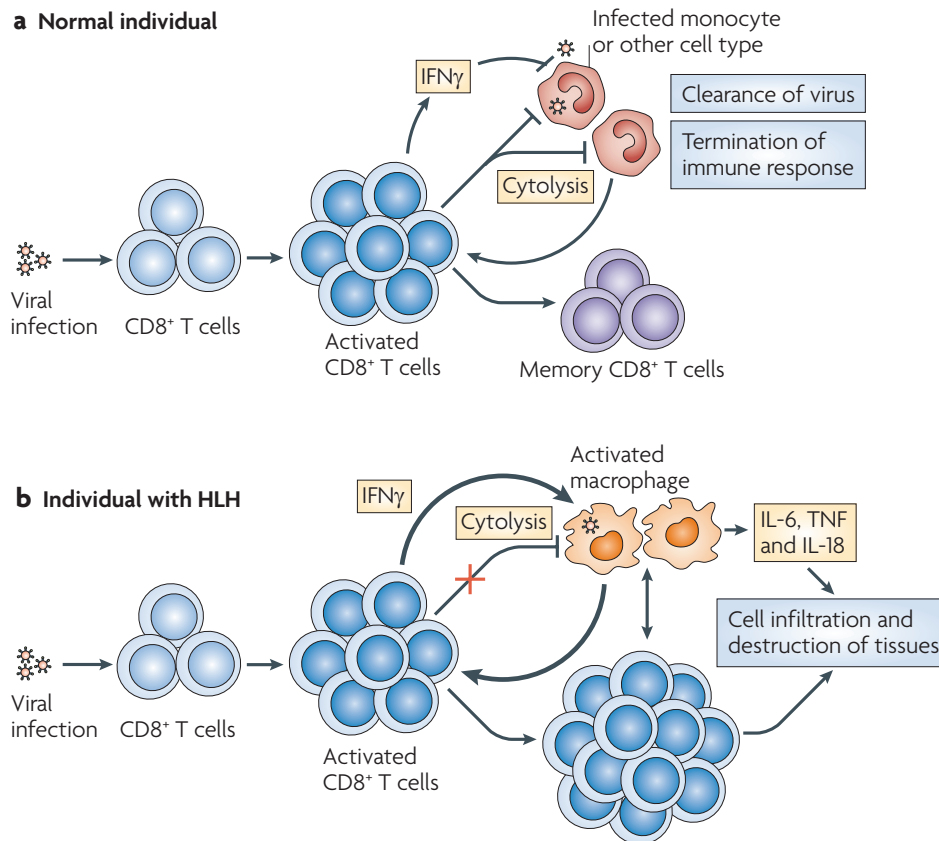


Abb. 6: Eine antigenspezifische CTL-Antwort auf eine virale Infektion in gesunden und HLH-Patienten. (a) Virale Infektion stimuliert die CTLs, dadurch unterziehen sie sich einer massiven klonalen Expansion. Es erfolgt eine Bekämpfung der infizierten Zellen mittels zellvermittelte Zytolyse und IFN- γ -Ausschüttung. Der Prozess der Immunantwort ist selbstlimitierend und die meisten Zellen sterben ab. Es verbleiben nur noch wenige CTL-Gedächtniszellen. (b) Bei den HLH-Patienten können die infizierten Zellen nicht abgetötet werden, wodurch es zu einer unkontrollierten klonalen Expansion der CTLs kommt. Außerdem sezernieren die CTLs eine hohe Konzentration an IFN- γ , dadurch werden Makrophagen aktiviert. Diese aktivieren wiederum die CTLs und sie sezernieren inflammatorische Zytokine (IFN- γ , TNF, IL-6 und IL-18), daraus resultiert eine unkontrollierte systemische inflammatorische Antwort. Aktivierte Makrophagen phagozytieren hämatopoetische Zellen und infiltrieren zusammen mit den aktivierten CTLs verschiedene Organe. Dies führt zu Organversagen und Nekrosen in den Organen (Quelle: de Saint Basile et al., 2010).

Die Behandlung erfolgt nach dem sogenannten HLH-94 Protokoll von der Histiocytosis Association of America, in dem die Patienten mit Dexamethason, Etoposide (VP-16), Cyclosporine und intrathekale Methotrexatgabe oder durch eine Stammzelltransplantation behandelt werden.

Neben der beschriebenen sekundären HLH existiert eine vererbte Form, die auf genetische Defekte beruht und als familiäre hämophagozytische Lymphohistozytose (FHL) bezeichnet wird. Die Inzidenz liegt bei 1 Fall pro 50.000 Geburten. Die

Erkrankung verläuft tödlich, wenn keine Behandlung erfolgt. Die mittlere Überlebenszeit entspricht etwa 2 - 6 Monate nach Diagnosestellung. Weniger als 10% der Patienten überleben 3 Jahre, selbst mit Behandlung überleben nur 21 – 26% 5 Jahre.

Gewöhnlich wird die Diagnose im ersten Lebensjahr gestellt, aber es sind auch Fälle bekannt, bei denen die Diagnose im Kindesalter oder sogar erst im Erwachsenenalter gestellt wurde.

Die FHL Form kann in 5 verschiedene Typen klassifiziert werden, wobei nur 4 spezifische genetische Defekte identifiziert wurden. Die Klassifizierung bezieht sich auf die genetische Analyse und chromosomale Lokalisation (Zur Stadt et al., 2006).

Tabelle 2: Klassifizierung der 5 bekannten genetischen Defekte

Typ	Ort/Gen
1	Chromosom 9
2	Perforin
3	Munc13-4
4	Syntaxin11
5	Syntaxin binding protein 2/Munc18-2

Außerdem gibt es zwei weitere genetische Erkrankungen, die ebenfalls FHL verursachen, das *Chediak-Higashi Syndrom* (Defekt des CHS1/LYST-Gens) sowie das *Griscelli-Syndrom Typ II* (Defekt des RAB27A-Gens) (Baetz et al., 1995; Menasche et al., 2000). Beide Proteine sind essenziell für den Transport der lytischen Granulen zur IS.

4.5.2 Fas/FasL-Signalweg

Neben dem lytischen Granulen-vermittelten Signalweg gibt es noch eine weitere Möglichkeit für die CTLs APCs zu töten, nämlich über den Fas/FasL-Signalweg (Berke, 1995; Kajino et al., 1998; Kojimo et al., 1994). Bei diesem Signalweg besitzen die CTLs ein Transmembranprotein, Fas Ligand (FasL) oder CD95L, das in der Plasmamembran integriert ist. Die APC synthetisieren den dazugehörigen Rezeptor (Fas-Rezeptor, Fas oder CD95) auf der Zelloberfläche, so dass der Ligand

mit diesem interagieren kann und somit die Apoptose dieser Zellen auslösen kann (Abb. 7).

Der FasL gehört zur Tumornekrose Faktor (tumor necrosis factor, TNF) Familie und spielt bei der Regulation des Immunsystems und bei der Progression von Krebs eine wichtige Rolle (Bennett et al., 1998;). Die FasL-Expression wird während der Reifung der CTLs hochreguliert, allerdings ist bisher unbekannt, worauf das Initialsignal beruht (Suda et al., 1993).

Nachdem sich drei FasL-Moleküle sich zusammengelagert haben, kann dieses Ensemble drei FasR binden, die eine sogenannte Death Domäne (death domains; DD) besitzen. Diese Domänen interagieren mit einer Death-effector Domäne eines Adapterproteins, Fas-associated death domain protein (FADD), das die Procaspase 8 aktiviert. Die aktive Caspase 8 aktiviert durch Peptidabspaltung die Proteine BID (BH3 interacting-domain death agonist) und die Procaspase 3. Das proapoptotische Protein BID transloziert zu den Mitochondrien und aktivieren weitere proapoptotische Proteine, wie z.B. Bax (Bcl-2-associated X protein) und Bak (Bcl-2 homologous antagonist). Zusammen sind sie für die Membranpermeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich. Dies hat zur Folge, dass Cytochrom C freigesetzt wird, wodurch die Procaspase 9 durch die Interaktion mit dem Adapterprotein apoptotic protease-activating factor 1 (APAF1) aktiviert wird. Durch die aktive Caspase 9 kann ebenfalls die Procaspase 3 aktiviert werden.

Die aktive Caspase 3 aktiviert zunächst die Procaspasen 7 danach aktivieren beide zusammen die Procaspase 6. Diese drei Caspasen induzieren die Hydrolyse verschiedener zytosolische Proteine, wodurch die Zelle nicht mehr lebensfähig ist (Thome and Tschopp, 2001).

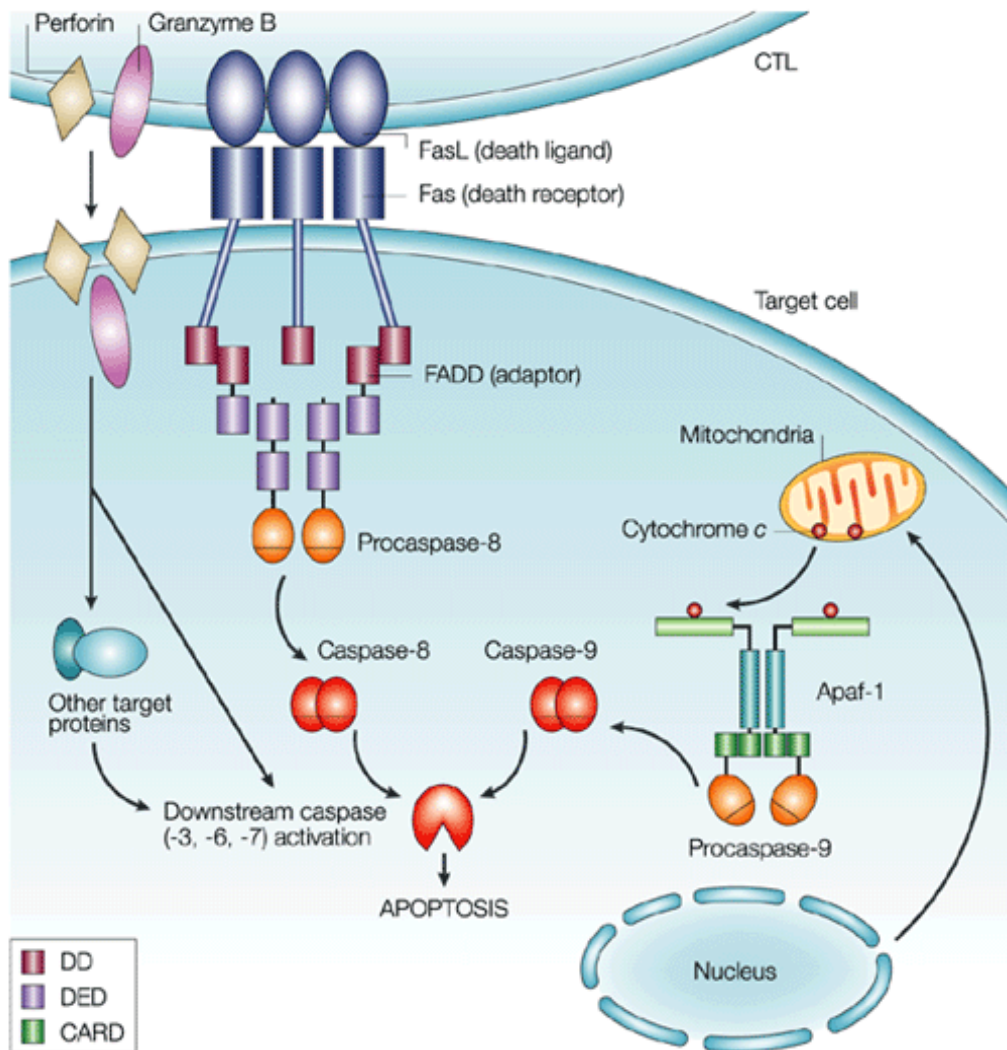


Abb. 7: Fas/FasL-Signalweg.

Nachdem der Fas Ligand an den Fas Rezeptor bindet wird über die FADD die Procaspase-8 aktiviert, indem diese in Caspase-8 gespalten wird. Diese Caspase spaltet wiederum verschiedene andere Procaspasen, wie Procaspase-3, -6, -7. Zusätzlich wird beim Untergang der Mitochondrien Cyt c freigesetzt, das über Apaf-1 die Procaspase-9 in Caspase-9 spaltet. Die aktiven Caspasen hydrolysieren viele Zielproteine, die für die Zelle essenziell sind (Quelle: Regulation of lymphocyte proliferation and death by flip, Thome M and Tschopp J, Nature Reviews Immunology 1, 50 – 58, 2001).

4.6 Aufgabenstellung / Zielsetzung der Arbeit

Anhand der FHL Patienten konnte Munc13-4 als das verantwortliche Gen für den Subtyp FHL3 charakterisiert werden.

Bisher konnte experimentell gezeigt werden, dass durch Genveränderungen von Munc13-4 lytische Granulen von CTLs und NKs nicht sezerniert werden. Die Hypothese ist, dass Munc13-4 ein Primingfaktor sein könnte und somit verantwortlich für die Fusionkompetenz der lytischen Granulen wäre. Es stellt sich die Frage, ob andere Primingfaktoren, die bereits in anderen Zelltypen charakterisiert worden sind, diese Aufgabe übernehmen könnten. Es war naheliegend, die Primingfaktoren zuerst zu untersuchen, die aus der gleichen Proteinfamilie stammen. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Expression von verschiedenen Munc13 Isoformen und deren Funktion auf die Exozytose von lytischen Granulen untersucht werden. Um das Protein Munc13-4 besser charakterisieren zu können, wurden die Untersuchungen in Mäusen durchgeführt, die kein funktionelles Munc13-4 Protein exprimieren (KO; Jinx-Maus).

Des Weiteren eignete sich dieses Modellsystem auch für die Charakterisierung der Zytotoxizität verschiedener Signalwege. Es ist bekannt, dass die CTLs sowohl mit der Exozytose lytischer Granulen als auch über den Fas/FasL-Signalweg die APCs abtöten können. Allerdings ist nur wenig über das Ausmaß beider Signalwege in CTLs bekannt. In der Literatur wird der lytische Granulen-vermittelte Signalweg als Hauptsignalweg bezeichnet, wogegen der Fas/FasL-Signalweg eine untergeordnete Rolle beim Abtöten der APCs spielt. Dadurch, dass die Jinx-Mäuse keine Sekretion der lytischen Granulen aufweisen und somit auch nicht in der Lage sind über den lytischen Granulen-vermittelten Signalweg die APCs abtöten zu können, eignet sich dieses Mausmodell hervorragend für die Untersuchung des Fas/FasL-Signalwegs.

5. Material

5.1 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Standardlaborchemikalien und Lösungen wurden von den Firmen VWR, Roche, Merck oder Sigma-Aldrich in der Qualität „zur Analyse“ bezogen.

Agarose	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	GE Healthcare
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Enhanced Chemiluminescence Substrat (ECL)	GE Healthcare
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Fetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen
Formaldehyd	Polysciences
Glukose	Merck
Glyzin	Roth
IST-X	Gibco
N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N-(ethansulfonsäure) (HEPES)	Sigma-Aldrich
NP-EGTA	Universität Hannover
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2)	Biosource
Propanol	Roth
Poly-L-Ornithin	Sigma
Triton-X 100	Roth
TRizol® Reagenz	Sigma-Aldrich

5.2 Farbstoffe

Fluo-4 AM	Molecular Probes
Fura-2 AM	Molecular Probes
Furaptra	Molecular Probes
Fura 4F	Molecular Probes

5.3 Molekularbiologische und biochemische Kits

Dynabeads® CD3/CD28 T Cell expander Mouse	Invitrogen
Dynabeads® FlowComp™ Mouse CD8	Invitrogen
Dynal® Mouse CD8 Negaitve Isolation Kit	Invitrogen
Mouse Granzyme B DuoSet	R&D Systems
Plasmid Maxi Prep Kit	Qiagen
Plasmid Midi Prep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green PCR Kits	Qiagen
RNeasy Protect Mini Kit	Qiagen

5.4 Größenstandards DNA/Proteine

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
λ DNA/EcoRI + HindIII	Labor Rettig
pUC DNA/MspI	Labor Rettig

5.5 Enzyme

Aprotinin	Sigma-Aldrich
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich
Collagenase F	Sigma-Aldrich

DNase I
 Papain
 Penicillin/Streptomycin
 Proteinase K
 Restriktionsnukleasen
 RNase H
 SuperScript II Reverse Transcriptase
 T4-DNA-Ligase
Taq-Polymerase
Pfu-Polymerase

Qiagen
 Sigma-Aldrich
 Gibco
 AppliChem
 Fermentas
 Fermentas
 Invitrogen
 Fermentas
 Sigma-Aldrich
 Fermentas

5.6 Antikörper

5.6.1 Primäre Antikörper

Anti-CD3	BD Pharmingen
Anti-CD3-Alexa674	eBioscience
Anti-CD28	BD Pharmingen
Anti-CD107a-FITC	BD Pharmingen
Anti-CD107a-PE	BD Pharmingen
Anti-FasL MFL3	BD Pharmingen
Anti-Granzym B	R & D System
Anti-Munc13-1	Labor Nils Brose
Anti-Munc13-4	Labor Martin Jung

5.6.2. Sekundäre Antikörper

Anti-rabbit konjugiert mit Horse Radish Peroxidase	Pierce
Anti-hamster-Alexa-647	Santa Cruz

5.7 Plasmide

5.7.1 Virusplasmid

pSFV1-mMunc13-4-IRES-GFP

5.7.2 Transfektionsplasmide

→ Back bone für alle Transfektionsplasmide ist eGFP-N1

mMunc13-4-EGFP

mMunc13-4-mCherry

mMunc13-1-EGFP

mPerforin-mCherry

5.8 Oligonukleotide

5.8.1 Klonierungsnukleotide für mMunc13-4

for: 5'-TACGATAGATCTAAGCCGCCACCATGGCGACACACCTTTCCC-3'

rev: 5'-CTTAGCACCGGTCACCACGGGGCATGTTGGGAGGCC-3'

5.8.2 Sequenzierungsnukleotide für mMunc13-4

5'-GGTACTCTATGCTGGTGATGGG-3'

5'-CCCATCACCAGCATAGAGTACC-3'

5'-GGCAGAGCAGTTGGAGGTGG-3'

5'-CCACTCAGAAGGACCTGTCGG-3'

5'-CCAAATTAGCCCACTGCC-3'

5'-GCATCGACTTCAAGGAGGACGG-3'

5.8.3 Oligonukleotide für die Genotypisierung

PCR

for: 5' GCTGTCTGTCAGTAGATGAGCAGAACTCTAGG 3'

rev: 5' CCTGATGAAATTCTTGGAGGTGAAGCTTTG 3'

Sequenzierung des PCR-Produktes

for: 5' CACACTAGATGCCTGGATCATG 3'

5.8.4 Oligonukleotide für alle Isoformen von Munc13

Munc13-1 for: 5'-GAGCCCAAAGAGTTCAAG-3'
rev: 5'-GTCTGGCATGCTGTCAAT-3'

bMunc13-2 for: 5'-GCTCTGCAGGGGGTATTTTC-3'
rev: 5'-AGTGGCAGTGGCTTCTTCC-3'

ubMunc13-2 for: 5'-TGGCTCCTCCTGTAATGTGA-3'
rev: 5'-AGTGGCAGTGGCTTCTTCC-3'

Munc13-3 for: 5'-GGCCTATAAGAAGCAGATG-3'
rev: 5'-ACCCACACTCCAGACACT-3'

Munc13-4 for: 5'-AAGATGTCAGCGGGTTCA-3'
rev: 5'-CGTCCTGGCCTTTATCCT-3'

5.9 Allgemeine Lösungen und Puffer

10 x PBS	NaCl	1,37	M
	KH ₂ PO ₄	14,7	mM
	Na ₂ HPO ₄	78,1	mM
	KCl	26,8	mM
	pH 7,4		
10 x TAE	Tris-Base	400	mM
	Acetat	400	mM
	EDTA	10	mM
	pH 8,5		
10 x TBS	Tris-HCl, pH8,0	100	mM
	NaCl	1,5	M
10 x Formaldehyd (FA) – Puffer	MOPS	50	mM
	Natriumacetat	50	mM
	EDTA	10	mM
	NaOH	100	mM
	pH 7,0		

20 X NuPage MOPS SDS running Buffer (Invitrogen)

20 x NuPage Transferbuffer (Invitrogen)

5.10 Medien und Agarplatten

LB-Medium	Trypton	10	g
	Hefeextrakt	5	g
	NaCl	5	g
ad 1000 ml, pH 7,5, autoklavieren			

LB-Platten	LB-Medium + autoklavieren	1,5	% (w/v)	Agar,
RPMI	RPMI (Gibco)			
	FCS	10	%	
	Penicillin/ Streptomycin	0,5	%	
IMDM	IMDM (Gibco)			
	FCS	10	%	
	Penicillin/ Streptomycin	0,5	%	
	β -ME	50	μ M	
DMEM	DMEM (Gibco)			
	Penicillin/ Streptomycin	0,5	%	
	IST-X	1	%	

5.11 Spezielle Geräte und weiteres Material

Mikroskope

SIM-Mikroskop	Zeiss
Axiovert 135	Zeiss
Olympus IX70	Olympus

Zentrifuge

Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Labofuge 400 R	Thermo Scientific

Elektrophysiologische Geräte

Heka EPC 9	Heka
PatchMan NP2	Eppendorf
Patch Pipette Puller PA-10	TSE System

Elektroporator

Bio-Rad Gene Pulser II	Bio-Rad
Amaxa Nucleofector II	Amaxa

Schüttler

IKA® KS 260 basic	IKA Werke
Reax	Heidolph

FACS

BD Canto II	BD
-------------	----

Plattenlesegerät

ELX 800 UV Universal Microplate Reader	Bio-TEK Instruments
--	---------------------

Molekularbiologische Geräte

Mastercycler	Eppendorf
Biophotometer	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf

5.12 Software

BD FACSDiva (Version 6.0)
 FlowJo (Version 7.6.4 / 9.3)
 Fucal 5.12 B (TILL-Photonics))
 ImageJ (Version 1.43u)
 Wavemetrics Igor Pro (Version 6.0.3.1)
 Corel Draw Graphics Suite (Version 14)
 ZEN 20093

6. Methoden

6.1 Tiermodelle

C57BL/6 Mäuse (WT-Mäuse) und homozygote Jinx-Mäuse (C57BL/6-Munc13-4 Jinx/Jinx) oder auch als Munc13-4-KO-Mäuse bezeichnet, wurden für die Experimente verwendet (Croizat et al., 2007). Die Jinx-Mäuse wurden ursprünglich durch ungerichtete Mutagenese mit ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) erzeugt und anhand des Phänotyps isoliert. Der Munc13-4 KO beruht auf einer Transversionsmutation von Guanin zu Thymin in Intron 26 des Munc13-4 Gens auf Chromosom 11. Durch diesen Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) kommt es zu einem vorzeitigen Translationsabbruch. Die Jinx-Mäuse wurden homozygot verpaart und zur Kontrolle wurde jede 3. Generation genotypisiert.

6.2 Primärzellen und Zelllinien

6.2.1 CD8⁺ T-Lymphozyten

Lymphozyten wurden aus der Milz gewonnen und mittels eines Isolationskits wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten isoliert.

6.2.1.1 Zellisolation und Proliferation

Die Milz wurde von 6 -9 Wochen alten Mäusen herauspräpariert und mittels eines Nylonsiebs (70 µm) dissoziiert. Die Zellen wurden in RPMI 1640 aufgenommen und bei 1000 rpm 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Erythrozyten mittels eines Erythrozytenlyse-Puffers lysiert. Dazu wurden die Zellen in 1 ml Puffer 45 sec bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 9 ml RPMI 1640 zu den Zellen pipettiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift.

Zum Aufreinigen der CD8⁺ T-Lymphozyten wurde das Dynabeads® FlowComp™ Mouse CD8 Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben benutzt. Die aufgereinigten Zellen waren zunächst unstimuliert und mussten in Effektorzellen differenziert

werden. Dazu wurden 1×10^6 Zellen/ml 3 Tage bei 37°C in IMDM und 50 U/ml rIL-2 und gleicher Anzahl von anti-CD3/CD28 Dynabeads® bei 5% CO_2 inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen 1:4 gesplittet.

Für die Restimulation der Zellen wurden die Beads mindestens 2 h vor einem Experiment entfernt und anschließend die gleiche Anzahl von Beads dazu gegeben oder die Zellen wurden auf Deckgläschen, die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 und 40 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28 für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert wurden, transferiert.

Erythrozytenlyse-Puffer	NH_4Cl	155	mM
	KHCO_3	10	mM
	EDTA	0,13	mM
	pH 7,3		
Puffer 1	1 x PBS		
	BSA	5	%
Medium	IMDM		
	FCS	10	%
	Penicillin/ Streptomycin	0,5	%

6.2.2 Antigenpräsentierende Zellen (APCs)

Als APCs diente die Zelllinie P815, eine Maus Lymphoblasten-ähnliche Mastocytoma Zelllinie. Die Zellen wurden in IMDM bei 37°C , 5% CO_2 kultiviert und jeden zweiten Tage 1:40 gesplittet.

Medium	IMDM		
	FCS	10	%
	Penicillin/ Streptomycin	0,5	%

6.2.3 Chromaffinzellen

Chromaffinzellen befinden sich in der Medulla der Nebenniere und schütten nach Stimulation die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus.

6.2.3.1 Zellisolation und Zellkultur

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden Chromaffinzellen aus der Nebenniere isoliert. Dazu wurden die Nebennieren von einer 3 Wochen alten Maus entnommen und in eiskalte „Dissociation solution“ transferiert, der Kortex der Nebenniere entfernt und die Medulla wurde in einer Papainlösung für 10 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die Papainlösung durch eine Collagenaselösung ersetzt. Nach 8 min bei 37°C wurden die Nebennieren mit einer Pasteurpipette trituriert und für weitere 4 – 5min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte ein weiterer Triturierung und anschließend wurden die Zellen und das restliche Gewebe bei 1000 rpm für 4 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in DMEM aufgenommen und nochmals gewaschen. Danach wurden die Zellen auf Deckgläschen, die bereits jeweils in einem Well der 6-Well-Platte überführt wurden, transferiert. Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert, damit sie sich absetzen konnten. Anschließend wurde 3 ml DMEM zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden bis zu 3 Tage bei 37°C mit 13% CO₂ inkubiert.

Dissociation Solution	L-Glutamat	80	mM
	NaCl	55	mM
	KCl	6	mM
	MgCl ₂	1	mM
	HEPES	10	mM
	Glukose	10	mM
	pH 7,0		
Papain Solution	Papain	22,5	U/ml
	BSA	2,5	mM
	DTT	75	µM

Collagenase Solution	Collagenase F	2,25 U/ml
	BSA	2,5 mM
	CaCl ₂	75 μM
Chromaffinzell – Medium	DMEM	
	ITS-X	1 %
	Penicillin/	
	Streptomycin	0,5 %

6.3 Physiologische und immunologische Methoden

6.3.1 Patch Clamp und Kapazitätsmessung

Mit der „whole-cell“ Konfiguration ist es nicht nur möglich Ströme, die durch die Zellmembran gehen, zu messen, sondern man kann auch Kapazitätsänderungen messen (Abb. 8). Die Kapazität einer Zelle wird definiert als die Ladungsmenge, die gebraucht wird, um ein bestimmtes Potential der Zelle zu erreichen. Die Kapazität der Membran ist proportional zu ihrer Fläche. Nimmt also die Membranfläche, durch beispielsweise Exozytose, zu, ändert sich die Kapazität. Die Kapazität lässt sich messen, indem eine sinusförmige Spannung angelegt wird, was eine sinusförmige Stromantwort zur Folge hat. Die Modulation der Stromantwort, d. h. die Amplitude der Sinuswelle und die Phasenverschiebung ist abhängig von der Größe der Zelle, da diese als Kondensator wirkt. Je größer die Zelle, desto kleiner ist die Amplitude und desto kleiner ist die Sinuswelle der Stromantwort. Durch diese beiden Größen lässt sich die Kapazität der Zelle errechnen.

Die Experimente wurden mit einer sinusförmigen Anregung mit einer Frequenz von 2 kHz und einer Amplitude von 30 mV über den Verstärker EPC 9 (HEKA Instruments) durchgeführt. Wobei das Ruhepotential bzw. das Haltepotential auf – 70 mV gesetzt wurde. Die Glaspipetten hatten einen Widerstand von 4 – 6 MΩ, dadurch war es möglich Zellen mit einem Serienwiderstand von < 18 MΩ zu messen.

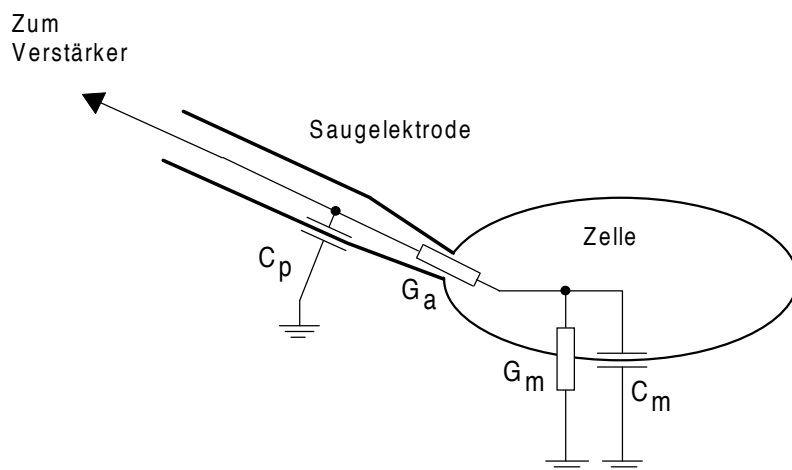
Zur Auswertung wurden die Daten mit dem Programm IGOR Pro 6.04 analysiert. Dazu wurden die Kapazitätmessdaten normalisiert und die Kalziummessdaten wurden mittels einer Kalibrierungsfunktion ermittelt.

Extrazelluläre Lösung

NaCl	145	mM
KCl	2,4	mM
HEPES	10	mM
MgCl ₂	4	mM
CaCl ₂	1	mM
Glukose	10	mM
pH 7,4		

Intrazelluläre Lösung

Cs-Glutamat	100	mM
Mg-ATP	2	mM
Na ₂ -GTP	0,3	mM
Cs-HEPES	40	mM
NP-EGTA	5	mM
CaCl ₂	4	mM
Furaptra	0,4	mM
Fura-4F	0,4	mM
pH 7,2		

**Abb. 8: Ersatzschaltbild einer Zelle im whole cell Modus.**

C_p : Pipettenkapazität, G_a : Zugangsleitfähigkeit, G_m : Membranleitfähigkeit, C_m : Membrankapazität

6.3.1.1 Photolyse der NP-EGTA zur Auslösung des Kalziumsignals

Die Exozytose der Chromaffinzellen wird durch intrazelluläre Kalziumerhöhung ausgelöst. Deshalb wurden die Zellen gepatcht und mittels Diffusion wurden Kalziumionen, die an einem Kalziumchelator NP-EGTA gebunden sind, in die Zelle transportiert. Der Kalziumchelator ist UV-instabil und zerfällt bei Applikation von UV-Lichtblitzen (Flash). Dadurch wird das gebundene Kalzium freigesetzt. Durch das Auslösen des Flashs wurden Kalziumleveln von 12 - 20 μM erreicht.

6.3.1.2 Kalziummessung während der Kapazitätsmessungen

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde mittels zwei kombinierter kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe gemessen. Zum einen wurde Fura-4F für den nanomolaren Bereich benutzt, da dieser Farbstoff eine hohe Kalziumaffinität ($K_d = 770 \text{ nM}$) besitzt und zum anderen wurde Fura-2 für den mikromolaren Bereich benutzt, da dieser Farbstoff eine niedrige Kalziumaffinität ($K_d = 25 \mu\text{M}$) besitzt.

Fura ist ein ratiometrischer Farbstoff, d. h. es liegt ein Absorptionsshift vor, wenn der Chelator Kalzium bindet. So wird der Farbstoff bei einer Wellenlänge von 340 nm bei nicht gebundenen Kalzium und bei einer Wellenlänge von 380 nm bei gebundenen Kalzium angeregt. Die Emissionswellenlänge in beiden Fällen liegt bei 510 nm. Wird das Verhältnis der beiden Emissionswerte gebildet, erhält man ein Maß für die Kalziumkonzentration.

6.3.2 Video-Imaging

Um eine Aussage über den Zustand der Zellen und die Aktivierbarkeit der T-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörper beschichteten Deckgläsern zu testen, wurden zytosolische Kalziummessungen über einen längeren Zeitraum (30 – 45 min) durchgeführt.

6.3.2.1 Aufbau des Fluoreszenzmikroskopmessplatzes

Für die Ca^{2+} -Messungen wurde ein Invert-Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 von Zeiss) mit einem Objektiv mit 40-facher Vergrößerung (Fluor 40 x, NA = 1,4) benutzt. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Hochdrucklampe, wobei das Spektrum aufgespalten wurde und die spezifischen Wellenlängen 340 nm und 380 nm wurden mittels eines dichroischen Spiegel direkt zu dem Objekt geleitet. Die Emissionswellenlänge passierte den dichroischen Spiegel und wurde auf eine charged-couple device (CCD) – Videokamera gelenkt. Die Bilder wurden zu einem Computer weitergeleitet, auf dem sie mit der Software Fucal 5.12 B (TILL-Photonics) ausgewertet wurden.

6.3.2.2 Intrazelluläre Kalziumkonzentrationsmessungen $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Für die zytosolische Kalziummessung wurden die CD8+ T-Lymphozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (Endkonzentration 2 μM) für 15 min bei 37°C beladen. Da dieser Farbstoff mit einem Acetomethylester ausgestattet ist, kann er trotz hydrophiler Eigenschaft in der Zelle angereichert werden. Der Ester wird durch unspezifische Esterasen der Zelle abgespalten. Fura-2 hat im Gegensatz zu Fura 4F und Fura-2/AM eine Dissoziationskonstante von 250 nM und kommt somit für die physiologischen Messungen, die im Bereich von 0,05 – 2 μM liegen, in Frage. Der Farbstoff wurde alternierend bei 340 nm und 380 nm mit einer Frequenz von 0,1 Hz angeregt.

6.3.3 Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM)

In der Lichtmikroskopie wird die Auflösung des mikroskopischen Bildes nach Ernst Abbe wie folgt begrenzt:

$$d = \lambda / 2 n \sin\alpha$$

wobei λ die Lichtwellenlänge, n die Brechzahl des Mediums zwischen dem Gegenstand und dem Objektiv und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs ist. Mittels moderner Technik kann diese Formel in der heutigen Mikroskopie umgangen werden. Eine dieser Techniken bedient sich der strukturierten Beleuchtung des Objektes (Structured Illumination Microscopy – SIM) (Schermelleh et al., 2008; Gustafsson et al., 2008) (Abb. 9).

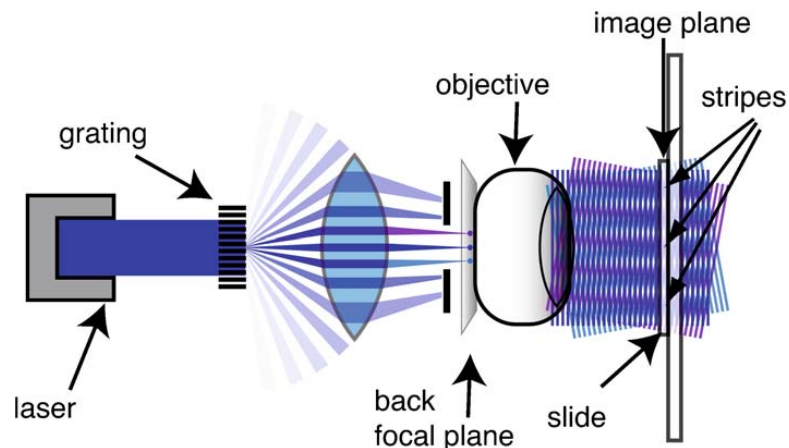


Abb. 9: Formation der strukturierten Beleuchtungsmusters.

Licht von einem Laser wird durch das Beugungsgitter, das den Laser in eine große Anzahl von diffraktierten Ordnungen aufspaltet, geleitet. Aber nur die drei zentrale diffraktierte Strahlen werden durch das Objektiv geleitet. Drei kohärente Wellenfronten vom Objektiv interferieren in der Probenebene und daraus resultiert ein Streifenmuster (Quelle: Carlton, 2008)

Live-cell Imaging Untersuchungen und Immunfärbungen wurden mit einem Prototypmikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Dieses Mikroskop verwendet die sogenannte „strukturierte Beleuchtung“ (Structured Illumination Microscopy (SIM)). Mit dieser Technik sind Auflösungen von ca. 100 nm in xy- und ca. 300 nm in z-Richtung möglich.

6.3.3.1 Einzelzellassay

Um die Aktivierung der CTLs und das Absterben der APCs zu beobachten, wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit 2 mM Fluo-4 beladen und bei 37°C 20 min inkubiert. Zusätzlich wurden die CD8+ T-Lymphozyten mit 1 µg/ml anti-CD3-Alexa 647 Antikörper inkubiert, damit sich die CD8+ T-Lymphozyten von den APCs

unterscheiden ließen, da sie optisch sehr ähnlich sind und fast die gleiche Größe aufweisen. Anschließend wurden die Zellen mit IMDM gewaschen und zu den CD8+ T-Lymphozyten wurde 1 µg/ml anti-CD3 Antikörper hinzugefügt. Die Zellen wurden auf 0,01 % Poly-L-Ornithin beschichteten Deckgläschen transferiert und im Wechsel wurde alle 10 s ein Durchlichtbild, ein Bild mit der Anregung von 647 nm für die Unterscheidung der Zellen und ein Bild mit der Anregung von 488 nm für die Kalziummessungen aufgenommen. Zur Analyse der Kalziumintensitäten wurde das Trackingprogramm EasyTrack benutzt.

6.3.4 ⁵¹Cr-Freisetzungssassay

Um zu untersuchen, ob und in welchem Maß die CTLs die APCs töten werden ein sogenannter ⁵¹Cr-Freisetzungssassay benutzt. Hierzu wurden die Mäuse mit einem LCMV-WE mit 5×10^2 pfu intravenös infiziert und nach 8 Tagen wurden die Milzen entnommen. Als APCs dienen MC57-Zellen, da diese den gleichen Haplotyp des MHC I-Komplexes wie auch die physiologischen APC der Maus aufweisen. Dadurch ist gewährleistet, dass die CTLs die Zielzellen erkennen und abtöten können. Die MC57-Zellen wurden ebenfalls mit LCMV-WE (multiplicity of infection (MOI) von 0,1) infiziert. Als Kontrollzellen dienen MC57-Zellen, die nicht infiziert wurden. Nach zwei Tagen können die Zellen für den Assay eingesetzt werden und wurden mit 100 µCi Na²⁵¹CrO₄ in HBS-Medium 60 min bei 37°C inkubiert. Aus den Milzen wurden die CD8+ T-Lymphozyten isoliert, indem die Zellen durch ein Sieb gepresst wurden und Fibroblasten und restliche Gewebestücke wurden 1 min bei 1000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die CD8+ T-Lymphozyten wurden in MEM-Medium überführt und entsprechend der verschiedenen Ratios auf eine 96-Well-Platte ausplattiert. Die Zielzellen wurden dazupipettiert, nach 6 h Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ wurde 25 µl entnommen und in einem Micro-beta Counter die Radioaktivität bestimmt. Um die spontane und maximale Freisetzung bestimmen zu können, wurden die Überstände von Zielzellen ohne Effektorzellen oder mit 1 N HCl behandelten Zielzellen gemessen. Die spezifische Lyse (in Prozent) wurde wie folgt kalkuliert:

spezifische Lyse (%) = $(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) / (\text{totale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) \times 100$

6.3.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie können Zellen in Suspension anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächenmoleküle oder intrazellulären Proteinen charakterisiert werden. Die Zellsuspension wird durch hydrodynamischen Druck, mit Hilfe der Hüllflüssigkeit in die Messkanüle gepresst, wobei die Zellen vereinzelt werden. Die Vereinzlung basiert auf verschiedenen Drücken der Zellsuspensionsflüssigkeit, die im Inneren vorhanden ist, und der Hüllflüssigkeit, die die Zellsuspensionsflüssigkeit umgibt. Die vereinzelten Zellen passieren einen oder mehrere fokussierte Laserstrahlen (Abb. 10). Durch die Ermittlung der Lichtintensitäten in verschiedene Raumrichtungen können Parameter wie Zellgröße und Granularität bestimmt werden. Außerdem kann durch Färbung verschiedener Proteine der Zelle mittels spezifischer Antikörper die Zelle weiter charakterisiert werden.

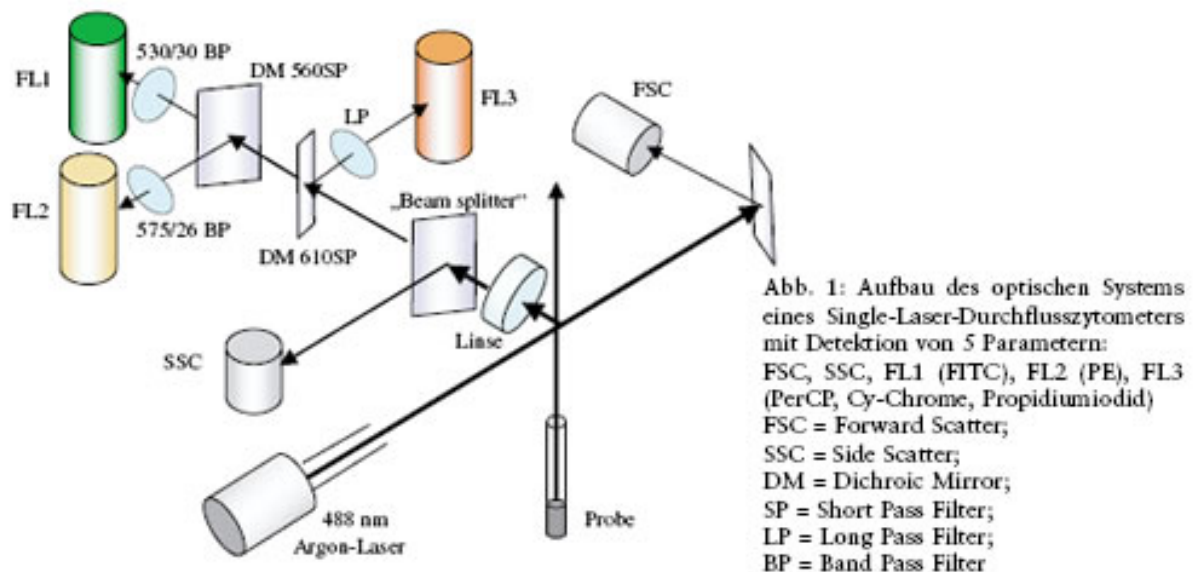


Abb. 10: Prinzip der durchflusszytometrischen Analyse

Die Zellen werden einzeln durch einen oder mehrere Laserstrahlen geleitet. Aufgrund der Granularität der Zelle wird das Licht gestreut. Das Maß der Streuung kann mit dem SSC detektiert werden. Die Größe der Zelle wird mit dem FSC analysiert. Die Fluoreszenzsignale der Zellen werden durch verschiedene Filter zu Photomultipliern geleitet (Quelle: http://www.klinikum.uniheidelberg.de/uploads/pics/HaemDiag_Bispiel5.jpg)

6.3.5.1 Degranulationsassay

Das Protein Lamp-1, oder auch als CD107a bezeichnet, ist ein lysosomaler Marker und erscheint auf der Zelloberfläche, wenn die Lysosomen mit der Zellmembran verschmelzen. Erst dann kann ein spezifischer Antikörper gegen Lamp-1 auf der Zelloberfläche binden. Die Sekretion von Lysosomen kann also durch die Bindung des Antikörpers anti-Lamp-1 (Lysosome associated membrane protein) als Marker für die Sekretion von Lysosomen quantifiziert werden.

2×10^5 CD8⁺ T-Lymphozyten in 200 μ l wurden für 4 h bei 37°C restimuliert, indem sie in Wells einer 96-Well-Platte, die mit anti-CD3 (10 μ g/ml) und anti-CD28 (40 μ g/ml) Antikörper beschichtet wurden, überführt wurden. Als Kontrolle für die konstitutive Degranulation dienten CD8⁺ T-Lymphozyten, die nicht restimuliert wurden. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 5 μ g/ml FITC-konjugierten anti-CD107a inkubiert.

Für Rescueexperimente wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten entweder mit mMunc13-4-eGFP oder mMunc13-1-eGFP transfiziert und nach 4 h wurden die Zellen restimuliert. Aufgrund der eGFP-Färbung wurde 2 μ g/ml PE-konjugierten anti-CD107a für diese Experimente anstatt den FITC-konjugierten anti-CD107a Antikörper eingesetzt.

Anschließend wurde die Expression von CD107a auf der Oberfläche mittels der Durchflusszytometrie analysiert.

6.4 Biochemische Methoden

6.4.1 Proteinisolierung aus Gewebe und Zellen

Für den Nachweis von Munc13-4 in verschiedenen Gewebe, wurden zunächst folgende Gewebe aus der Maus präpariert: Augen, Gehirn, Herz, Lunge, Pankreas, Milz, Niere, Nebenniere, Leber, Darm, Muskel und Testis. Das Gewebe wurde, nachdem es gewogen wurde, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels eines Mörsers pulverisiert. 1 g Gewebe wurde mit 500 μ l Lysepuffer lysiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat mit 5 x 15 s Ultraschall vollständig aufgeschlossen. Danach wurden die Proben mit 250 μ l ddH₂O pro 1 g

Gewebe verdünnt und 45 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Für die Detektion von verschiedenen exprimierten Proteine in CD8+ T-Lymphozyten wurden 10 Millionen Zellen in 50 µl Lysepuffer aufgenommen und mittels einer Spritze mit einer 27 G Kanüle aufgeschlossen. Das Lysat wurde 30 min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert und anschließend 45 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration des Überstands wurde mit dem Bradford Assay bestimmt.

Lysepuffer	Tris-HCl pH 7,5	50	mM
	NaCl	100	mM
	Triton X-100	1	%
	PMSF	250	µM
	Deoxycholat	60	nM
	EDTA pH 8,0	1	mM
	DTT	1	mM
	Protease Inhibitoren		

6.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assays

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der Bradford Assay genutzt, der auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm beruht. Die Proteinkonzentration ließ sich dabei aus einer Eichkurve ablesen, die zuvor mit Proteinlösung definierter Konzentrationen angelegt wurde. Zur Messung wurden 1 ml Bradford Assay Reagenz zu 20 µl verdünnter Proteinlösung hinzugefügt und die Absorption bei 595 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen.

6.4.3 Antikörper gegen Munc13-4

Da ein Antikörper gegen Munc13-4 für Maus nicht käuflich erwerbbar war, wurde ein Antikörper in der Arbeitsgruppe Martin Jung (Biochemie) hergestellt.

6.4.3.1 Herstellung von Antikörpern

Für die Immunisierung der Kaninchen wurde die Peptide (N-Terminus: LSHPQRRPLLQAIKI und C-Terminus: KLRRQRAKQASQHAP) gegen die der Antikörper gebildet werden soll mit einem Adjuvanz zweimal im Abstand von 3 Monaten injiziert.

Alle drei Wochen wurde Blut entnommen und durch Zentrifugation wurde das Serum gewonnen. Bis zur Verwendung wurde das Serum bei - 20°C eingefroren.

6.4.3.2 Aufreinigung des Munc13-4-Antikörpers

Nachdem alle Seren (Kontrollserum, Serum 1 – 7) gewonnen waren, wurde mittels Dot Blot (siehe 2.5.4 Dot Blot) getestet, in welchem Serum die Antikörper mit der höchsten Affinität zum Peptid beinhaltet sind. Die Qualität der Seren spiegeln sich in der Stärke des Signals im Dot Blot wider, d.h. je stärker das Signal, um so höher die Konzentration an Antikörpern, die eine hohe Affinität zu dem Peptid besitzen. In diesem Fall war es das Endserum, das dann auch für die Aufreinigung benutzt wurde.

6.4.3.2.1 Affinitätschromatographie

Die Methode der Affinitätschromatographie beruht auf ein Trennverfahren, wobei ein Analyt, hier Antikörper, durch Bindung an einen Liganden, hier Peptid, aus einer Lösung isoliert werden kann. Die Trennung erfolgt über eine Säule, die aus einer Gelmatrix besteht und den Liganden bindet.

Für die Gelmatrix wurde CNBr-aktivierte Sepharose 4B verwendet. Es wurden 0,3 g Sepharose in 10 ml 1 mM HCl gelöst und über Nacht bei 4°C zum Quellen inkubiert. Die gequollene Sepharose wurde mittels eines Glasfilters und 200 ml 1 mM HCl gewaschen und anschließend mit Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl pH 8,3) gespült. 5 mg Peptid wurde in 10 ml Kopplungspuffer gelöst und die Sepharose wurde darin überführt. Damit das Peptid an die Sepharose binden kann, wurde Sepharose mit dem Peptid auf einem Rotationsschüttler bei 4°C über Nacht inkubiert. Um die nichtgebundenen Bestandteile zu entfernen, wurde die Sepharose in eine Säule überführt und mit 20 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Anschließend wurde 10 ml Endserum in 90 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 verdünnt und auf die Säule überführt. Der Durchfluss wurde aufgefangen und nochmals auf die Säule überführt. Dieser Vorgang wurde noch einmal durchgeführt. Danach wurden die nichtspezifischen Antikörper mit 40 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 und 40 ml 500 mM NaCl/10 mM Tris-HCl pH 7,5 von der Säule gewaschen. Der spezifische Antikörper wurde mit 20 ml 100 mM Glyzin pH 2,7 eluiert, wobei das Eluat in 2 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 rührend aufgefangen wurde. Es erfolgte ein Waschschriff mit 10 mM Tris-HCl pH 8,8 bis das Eluat ein pH-Wert von 8,8 aufwies. Danach wurde ein zweiter Eluationsschritt mit 20 ml 100 mM Triethylamin pH 11,5 durchgeführt, für den Fall, dass die Affinität des Antikörpers so stark ist, dass dieser nicht mit Glyzin eluiert werden kann. Die Säule wurde mit 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen bis das Eluat einen pH von 7,5 erreicht hatte.

Die Eluate wurden mittels eines Dialyseschlauchs und mit 2 l 1 x PBS über Nacht bei 4°C dialysiert und mittels eines Amiconröhrchens Ultra-15 30K Filter (Merck Millipore) konzentriert. Zur Überprüfung, ob die Affinitätschromatographie erfolgreich war, wurden die Eluate und die Waschfraktionen, sowie das Serum auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Bromphenolblau wurden die Proteine angefärbt. Die Konzentration wurde mittels einer BSA-Konzentrationsreihe, die ebenfalls auf ein Gel aufgetragen worden ist und unter den gleichen Bedingungen gefärbt wurde, bestimmt.

6.4.4 Dot Blot

Beim Dot Blot werden kleine Tropfen einer Proteinlösung oder Peptidlösung auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und trocknen gelassen. Danach kann das Protein, das nachgewiesen werden soll mit dem entsprechenden Antikörper detektiert werden.

Für die Aufreinigung des Antikörpers Munc13-4 wurden die Peptide (N-Terminus: LSHPQRRPLLQRQAIKI und C-Terminus: KLRRQRAKQASQHAP) in einer Konzentration von 1 mg/ml in ddH₂O gelöst. Danach wurde für jedes Serum, das getestet werden sollte 1 µg auf Nitrocellulose aufgetragen und getrocknet. Die unspezifischen Bindestellen wurden mit 5%-Milch-TBST-Lösung für 30 min bei RT blockiert. Danach wurden die Seren 1:1000 in 5%-Milch-TBST-Lösung verdünnt und auf die Membran transferiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Membran 3 x 5 min mit TBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper goat anti-rabbit Antikörper 1:10000 für 30 min inkubiert. Danach wurde die Membran nochmals 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation mit einer ECL-Lösung für 1 min. Mit einem Röntgenfilm konnte das Lumineszenzsignal detektiert werden. Das Serum, das das stärkste Signal ergab, wurde für die Aufreinigung benutzt.

Nach der Aufreinigung wurde nochmals ein Dot Blot durchgeführt, um die Affinität des Antikörpers zu ermitteln.

Dazu wurden verschiedene Konzentration des Peptids KLRRQRAKQASQHAP (1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg und 10 µg) auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und anschließend erfolgte die Detektion, wie oben beschrieben.

6.4.5 Western Blot

Nachdem die Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt sind, können die Proteine in einem elektrischen Feld auf Nitrocellulosemembran übertragen werden. Das Zielprotein kann anschließend mit dem entsprechenden Antikörper detektiert werden. Die Detektion kann mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

Die Proteine wurden bei 300 mA über 2 h auf die immobilisierende Membran transferiert und anschließend mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um die Qualität

des Transfers zu überprüfen. Nach dem Entfärben mit ddH₂O wurden die unspezifischen Antigene auf der Nitrozellulosemembran in 5% - Milch-Tris buffered saline 0,05 % Tween 20 (TBST) über 45 min inkubiert. Danach erfolgte zum Nachweis spezifischer Proteine eine 90 minütige bei RT oder über Nacht bei 4°C Inkubation mit einem entsprechenden primären Antikörper (rabbit-anti-mouse Munc13-4 (1:1.000), Armenia hamster-anti-mouse FasL (1:1.000), rabbit-anti-mouse GAPDH (1:2.000), rabbit-anti-mouse α -Tubulin (1:5.000)). Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) (1:10.000), goat-anti-Armenia hamster horseradish peroxidase (HRP) (1:10.000)) 45 min in 5%-Milch-TBST inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Das Enzym HRP oxidiert Luminol, wobei Licht freigesetzt wird. Durch auflegen eines Autoradiographiefilms kann das Licht eingefangen werden und an der entsprechenden Stelle auf dem Film erscheint nach Entwicklung eine schwarze Bande. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde enhanced chemiluminescence (ECL) nach Herstelleranweisung benutzt. Die Belichtungszeit des Autoradiographiefilms variierte von 5 s bis 45 min. Anschließend erfolgte die Entwicklung und Fixierung des Films.

Transferpuffer 1 x + 20 % Methanol

6.4.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Bei diesem Verfahren können vor allem Proteine und Viren, aber auch andere Substanzen, wie Antikörper, Hormone, Toxine und Pestizide nachgewiesen werden. Um Proteine nachzuweisen, werden häufig sogenannte Sandwich-ELISAs verwendet. Dabei wird zunächst der Boden einer Mikrotiterplatte mit einem Antikörper, der das gesuchte Protein spezifisch bindet, beschichtet. Das gebundene Protein kann dann von einem zweiten spezifischen Antikörper, der ein anderes Epitop erkennt, identifiziert werden. Dieser Antikörper ist mit einem Enzym (meistens Meerrettichperoxidase, HRP) gekoppelt, das bei Zugabe von Wasserstoffperoxid (Substrat) Protonen freisetzt, die Luminol unter Bildung von

Chemilumineszenz oxidieren. Die Intensität der Chemilumineszenz ist der gebundenen Menge des Proteins proportional und mittels einer Kalibrierungskurve kann die Konzentration ermittelt werden.

6.4.6.1 Granzym B ELISA

Um die Freisetzung von Granzym B in WT- und KO-CTL zu vergleichen wurden drei Tage stimulierte Zellen für den Assay benutzt. Dazu wurden neun Wells mit 50.000 Zellen pro Well ausplattiert und für mindestens 4 h bei 37°C 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand von drei Wells für den 0-Wert entnommen und anschließend wurden die Zellen mit 1% Triton für die Totalwertbestimmung lysiert. Die übrigen Zellen wurden mit der gleichen Anzahl an anti-CD3/CD28 beschichteten Beads stimuliert. Nach einer und nach vier Stunden wurde wie oben beschrieben der Überstand und der Überstand von den lysierten Zellen in 200 µl Röhrchen überführt. Für jeden Zeitpunkt wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Der Granzym B ELISA wurde mittels des Granzym B Duo-Set von R&D Systems nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.5 Morphologische Methoden

6.5.1 Immunfärbung

Für den Nachweis der Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle wird das Verfahren der Immunfärbung verwendet. Es gibt zwei Verfahren um Proteine zu detektieren, zum einen kann man transfizierte Zellen verwenden oder zum anderen Zellen, deren Proteine durch Bindung von Antikörpern lokalisiert werden. Dazu werden die Zellen fixiert und anschließend mit Antikörpern, die entweder selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind oder mit einem sekundären Fluoreszenzgekoppelten Antikörper detektiert werden, gefärbt.

Damit die Zellen auf den Deckgläsern haften bleiben, wurden diese für 20 min mit 0,1%-igem L-Polyornithin beschichtet. 5×10^5 CD8⁺ T-Lymphozyten oder jeweils 2,5

$\times 10^5$ CD8⁺ T-Lymphozyten und Zielzellen wurden auf die beschichteten Deckgläsern pipettiert und mindestens 20 min in IMDM-Medium absetzen gelassen. Die Zellen wurden mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und 20 min mit eiskaltem 4%-igem Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte eine 3 minütige Inkubation mit 0,1 M Glyzin/1 x PBS und einem Waschschrift mit 1 x PBS. Für die Permeabilisierung und Blockierung wurden die Deckgläser in 2% BSA/0,1% Triton X-100/1 x PBS überführt und 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit der Antikörperlösung (primärer Antikörper wird in 2% BSA/0,1% Triton X-100/1 x PBS überführt) für 1,5 h bei RT. Danach wurden die nicht gebundenen Antikörper durch 3 x 10 min mit 0,1% Triton X-100/1 x PBS entfernt. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:2.000 Alexa-488, -561 oder 647) in 2% BSA/0,1% Triton X-100/1 x PBS für 45 min bei RT. Danach wurden die Zellen nochmals 2 x 10 min mit 0,1% Triton X-100/1 x PBS und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden in A. dest geschwenkt und auf einen Objektträger mit einem Tropfen Mounting Medium transferiert und über Nacht bei RT trocknen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser mit Hilfe von Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

6.5.2 Elektronenmikroskopie

Die Analyse der Lysosomen in den CD8⁺ T-Lymphozyten nach Ausbildung der IS, wurde mit der Elektronenmikroskopie durchgeführt. Dazu wurden 200 μ l 3 d stimulierte CD8⁺ T-Lymphozyten (4×10^6 Zellen/ml) von WT und Munc13-4-KO Mäusen auf Saphirscheiben, die zuvor mit 70 %-igem Ethanol gereinigt wurden und mit anti-CD3 (10 μ g/ml) und anti-CD28 (40 μ g/ml) Antikörper beschichtet. Nach 1 h oder nach 4 h Inkubation bei 37°C in 5 % CO₂ wurden mit einer sogenannten Hochdruckgefrierprozess (high-pressure freezer (EM PACT2, Leica) in IMDM mit 50% FCS in einem speziellen Objektträger eingefroren. Nach dem Einfrieren wurden die Zellen in einer automatischen Gefriersubstitutionsapparatur (AFS2 Leica) fixiert (Edelmann et al., 2007). Dazu wurden die Zellen mit 2 % Osmiumtetroxid in wasserfreies Azeton und 2 % H₂O überführt. Die Temperatur wurde linear von - 90°C auf - 70°C über 20 h, von - 70°C auf - 50°C über 20 h und von - 50°C auf - 10°C über 4 h und schließlich auf 20°C erhöht. Nach mehreren Waschschriften mit Azeton

wurden die Zellen in Epon-812 (Electron Microscopy Sciences). eingebettet. Die Infiltration erfolgt mit 30 % Epon/Azeton über 10 min bei - 10°C, 70 % Epon/Azeton über 1 h bei - 10°C und schließlich 100 % Epon über eine 1 h bei 20°C. Anschließend wurde die Temperatur von 20°C auf 60°C linear erhöht und auf 60°C über 1 Tag für die Polymerisation gehalten. Nach der Auspolymerisation wurde der Objektträger und die Saphirscheibe aus dem Eponblock unter Benutzung von flüssigem Stickstoff entfernt. Die eingebetteten Zellen wurden auf der Oberfläche des Blockes mittels der Lichtmikroskopie auf strukturelle Integrität und Verteilung inspiziert. Anschließend wurde der Eponblock hinsichtlich der Region, die von Interesse ist, mit einer Rasierklinge zu recht geschnitten. Für die ultradünnen Schnitte (70 nm) wurde senkrecht zur ehemaligen Saphirscheibe mit Hilfe des Ultramikrotoms EM UC7 (Leica Microsystems, Wetzlar) geschnitten. Diese Schnitten wurden auf pioloformbeschichtete Kupfernetze gesammelt und anschließend mit Uranylazetat und Bleizitrat angefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem Philips Tecnai 12 Biotwin Elektronenmikroskop. Für die Analyse wurden ausschließlich Zellen mit einer vollständigen IS-Bildung und einem großen Nukleus ausgewählt. Es wurden anhand der Färbung die lytischen Granulen ausgezählt. Dieses Experiment wurde von Dr. Claudia Schirra (AG Rettig) durchgeführt.

6.6 Mikrobiologische Methoden

6.6.1 Herstellung von Plattenkulturen

Bakterien wurden mit Hilfe einer Impföse von einer Agarkultur oder 100 µl einer Flüssigbakterienkultur wurden mittels Drigalski-Spatel auf der LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.6.2 Flüssigkulturen von *E.coli*

E.coli Bakterien wurden in LB-Medium mit Antibiotikum (1:1.000 Kanamycin) überführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert.

6.6.3 Transformation von *E.coli*

Damit Bakterien von außen zugeführte DNA aufnehmen können, müssen diese für diesen Prozess der Transformation vorbereitet werden. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei 37°C unter schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 5 – 10 min auf Eis inkubiert und bei 5.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 5.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und die Zellen wurden in 1 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Bakterien bei -80°C eingefroren.

6.6.3.1 Hitzeschock-Transformation

Für die Hitzeschock-Transformation wurde 10 ng DNA zu 100 µl kompetente Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 37°C und danach noch einmal eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Nach der Inkubation wurde 300 µl LB-Medium zu den Zellen pipettiert und noch mal 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf eine entsprechende vorgewärmte Agarplatte ausplattiert und über Nacht aber nicht länger als 16 h im Inkubator bei 37°C inkubiert.

6.7 Molekularbiologische Methoden

6.7.1 Isolierung, Aufreinigung und Aufarbeitung von Nukleinsäuren

6.7.1.1 Plasmid-Isolierung

Bei der Plasmid-Isolierung soll nur das Plasmid mit dem Zielgen, das zuvor mittels Transformation in die *E. coli* Bakterien hineingeschleust worden ist und durch Wachstum der Bakterien vervielfältigt wurde, getrennt von der genomischen Bakterien-DNA aufgereinigt werden.

Das Prinzip der Aufreinigung ist für alle drei Aufreinigungsarten (Mini-, Midi-, Maxipräparation) gleich. Die Bakterien werden lysiert und dabei denaturiert sowohl die chromosomale DNA als auch die Plasmid-DNA in Gegenwart von NaOH. Durch Zugabe von Natriumazetat renaturiert nur die ringförmige Plasmid-DNA, während die chromosomale DNA, die an der Bakterienmembran verankert ist, mit den bakteriellen Zelldebris durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt wird. Zum Aufreinigen der DNA wird diese mit Isopropanol und/oder Ethanol gefällt.

6.7.1.1.1 Plasmid-Minipräparation

Bei der Minipräparation handelt es sich um eine Plasmid-Isolierung im kleineren Maßstab, dies bedeutet, dass 2 ml Bakterienkultur über Nacht aber nicht länger als 16 h auf einem Eppendorfröhrchenschüttler bei maximaler Schüttelgeschwindigkeit geschüttelt wurden. Danach wurden die Kulturen 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und anschließend wurde die DNA mittels QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen aufgereinigt. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben für high copy plasmid DNA.

6.7.1.1.2 Plasmid-Midipräparation

Hier wird DNA aus einer größeren Bakterienkultur gewonnen. In unserem Fall wurden 50 ml Bakterienkultur über Nacht in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 210 rpm bei 37°C geschüttelt. Für die Aufreinigung wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet und nach Herstellerangaben für high copy-plasmid DNA die DNA aufgereinigt.

6.7.1.1.3 Plasmid-Maxipräparation

Für die Maxipräparation wurde 250 ml einer Bakterienkultur angesetzt, in dem zu vor eine Vorkultur von 2 ml angesetzt wurde und diese mindestens 8 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde eine 1:500 Verdünnung in selektivem LB-Medium

hergestellt und bei 210 rpm 37°C über Nacht geschüttelt. Je nach Aufgabenstellung oder Verwendung der DNA wurde eine Maxipräparation nach dem Protokoll von QIAGEN Plasmid Maxi Kit oder eine endotoxinfreie Maxipräparation nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.7.1.1.4 Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung der KO-Mäuse wurde genomische DNA aus Gewebe der Mäuse isoliert. Dazu wurde ein kleines Loch aus dem Ohr der Maus herausgestanzt und mit 90 µl Lyselösung (ViaGen DirektPCR Tail von Viagenbiotech) und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 55°C mindestens 4 h oder über Nacht inkubiert. Um die Proteinase K zu inhibieren wurde das Lysat 1 h bei 85°C inkubiert.

6.7.1.1.4.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde 0,5 µl des Gewebelysates mit 49,5 µl des folgenden PCR-Mastermix in ein PCR-Röhrchen überführt.

Mastermix

1	µl dNTPs
0,5	µl forward Primer
0,5	µl reverse Primer
5	µl 10 x Puffer
2	µl <i>Taq</i> -Polymerase
40,5	µl ddH ₂ O
<hr/>	
50	µl

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt.

94°C	2 min	1 Zyklus
94°C	30 s	40 Zyklen
58°C	30 s	40 Zyklen
72°C	40 s	40 Zyklen
72°C	7 min	1 Zyklus
4°C		

Da der knock-out des Proteins durch ein Polymorphismus des Gens verursacht wird, musste der PCR-Ansatz sequenziert werden.

6.7.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Total-RNA wurde aus 3 d stimulierten CD8+ T-Lymphozyten und dem Gehirn mittels Trizol Reagenz isoliert. Dazu wurden 2×10^7 Zellen in 1 ml Trizol Reagenz mittels einer Spritze mit einer 27 G Kanüle oder Hirngewebe einer Maus in 1 ml Trizol Reagenz mit einem Stößel in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß homogenisiert. Dies wurde mit den QIASHredder, Säulen mit einer porösen Substanz von Qiagen vervollständig, in dem die Suspension auf die Säule gegeben und für 1 min mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Durchfluss mit 12.000 g 10 min bei 2 – 8°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 15 -30°C inkubiert. Danach wurde 200 µl Chloroform dazu gegeben und für 15 s geschüttelt. Nach 2 -3 min Inkubation bei RT wurden die Proben abzentrifugiert. Dabei entstehen 4 Phasen (untere rote Phase, Phenol-Chloroform Phase, Interphase und obere wässrige Phase), die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Evtl. genomische DNA Kontaminationen wurden mittels eines DNase-Verdau entfernt und anschließend wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Dazu wurden die RNA-Proben auf die Säulen pipettiert und mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt von 15 s und 12.000 g wurde 80 µl DNase Lösung (10 µl DNase I Stocklösung und 70 µl RDD Puffer) jeweils auf die Säulen pipettiert und bei RT für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit 350 RW1

Puffer gewaschen und 15 s 12.000 g abzentrifugiert. Ein weiterer Waschschrift mit 700 µl RW1 Puffer folgte. Zum Fällen der Nukleinsäuren wurde 500 µl RPE Puffer mit Ethanol auf die Säule pipettiert und für 15 s bei 12.000 g abzentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurde die Säule zweimal abzentrifugiert und jeweils nach der Zentrifugation in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Zum eluieren wurde 30 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben und 15 s bei 12.000 g abzentrifugiert. Um die Effizienz der Eluation zu erhöhen, wurde der Durchfluss nochmals auf die Membran pipettiert und anschließend wieder 15 s 12.000 g abzentrifugiert.

6.7.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente, die aus einem Plasmid mit Hilfe von Restriktionsenzyme geschnitten werden von dem Rest des Plasmids zu trennen, werden die linearisierten DNA-Fragmente der Größe nach mit der Gelelektrophorese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Aber auch DNA, die durch PCR amplifiziert wird und anschließend von unspezifischen PCR-Produkte durch die Gelelektrophorese von diesen getrennt werden. Das Fragment mit der erwünschten Größe kann dann aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Glasmilch aus der Agarose isoliert werden. Die Glasmilch dient als Anionenaustauscher und bindet in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen DNA, die nach dem Waschen wieder mit ddH₂O gelöst werden kann.

Für die Klonierung von mMunc13-4-mCherry und mMunc13-4-eGFP wurde von der aufgereinigten DNA, die käuflich von IMAGEN erworben wurde, eine PCR zur Amplifizierung der cDNA von mMunc13-4 vorgenommen und anschließend auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde mittels dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

6.7.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Für die Quantifizierung von Nukleinsäuren gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann die Konzentration mittels Photometer bestimmt werden und zum anderen kann

sie aber über ein Agarosegel abgeschätzt werden. Im ersten Fall wird bei einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion gemessen. Die Konzentration kann anhand folgender Formel bestimmt werden. $E_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA bei einem pH-Wert von 7,0. Um die Reinheit von der DNA/RNA-Lösung bestimmen zu können, wird die Kontamination von Proteinen mittels der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Das Verhältnis der Wellenlängen 260 und 280 sollte bei einer reinen DNA/RNA-Lösung über 1,8 sein. Bei der zweiten Variante der Konzentrationsbestimmung wird die DNA mit einem DNA-Marker, dessen Konzentration bekannt ist auf ein Gel aufgetragen. Anschließend kann die Konzentration abgeschätzt werden. Allerdings sollte hierbei nur linearisierte DNA verwendet werden, da ansonsten mehrere Banden auf dem Gel zu sehen sind. Diese kommen durch die unterschiedlichen Konformationsstrukturen, wie coiled, coiled-coiled und super-coiled, zustande.

6.7.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine effektive Methode, um eine geringe Konzentration an DNA zu amplifizieren. Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung einer DNA-Sequenz zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an den entsprechenden komplementären DNA-Stränge gebunden sind. Dieser Prozess kann in drei Schritte, die einem Zyklus entsprechen, eingeteilt werden. Beim ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang auf 95°C erhitzt, dadurch trennen sich beide Stränge voneinander. Dies wird als Denaturierung bezeichnet. Der zweite Schritt dient der Primeranlagerung (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Primerlänge und Primersequenz und liegen zwischen 45°C und 72°C (Rychlik et al., 1990). Die Temperatur sollte etwa 3°C unter der Schmelztemperatur des Primers liegen. Ist sie zu niedrig, kommt es zu unspezifischen Basenpaarungen, ist sie zu hoch lagert sich der Primer nicht an die Ziel-DNA an. Der dritte Schritt ist die Elongation. Bei 72°C vervollständigt eine thermostabile Polymerase vom Primer aus den DNA-Strang. Die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* besitzt im Gegensatz zu der *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* oder *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrektur (proofreading) erlaubt. Deshalb wird

meistens ein Gemisch aus Taq-Polymerase, da diese eine hohe Syntheserate besitzt, und eine Polymerase, die die 3'-5'-Korrekturlesefunktion besitzt, benutzt (Cline et al., 1996). Die Zyklen – Denaturierung, Hybridisierung, Elongation – werden 30 – 40 mal wiederholt.

Der PCR-Ansatz für die mMunc13-4-Sequenz wurde wie folgt pipettiert.

0,5 µl DNA
 1 µl dNTPs
 0,5 µl forward Primer (50 pmol/µl)
 0,5 µl reverse Primer (50 pmol/µl)
 5 µl 10 x *Pfu*-Puffer + MgCl₂
 1 µl *Pfu*
 41,5 µl ddH₂O

Die *Pfu*-Polymerase besitzt eine Syntheserate von 1 kb/2 min. Deshalb wurde die PCR, wie in dem folgenden Schema dargestellt, durchgeführt.

95°C	2 min	}	40 x
95°C	30 sec		
58°C	30 sec		
72°C	6 min		
72°C	7 min		
4°C	→ bis zur weiteren Verwendung		

6.7.4.1 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Um mRNA zu amplifizieren, muß diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Danach kann die Nukleinsäure mittels der PCR-Technik amplifiziert werden. Dies kann in einem Schritt durchgeführt werden. Aber in unserem Fall wurden die zwei Schritte nacheinander durchgeführt, um die cDNA über photometrische Messungen zu quantifizieren. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Dazu wurde die RNA mit 1 µl Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl) und mit RNase

freies Wasser auf 12 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend kurz auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Danach wurden 4 µl 5 x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix dazu pipettiert und gut gemischt. Die Proben wurden bei 25°C 2 min inkubiert und anschließend wurde 1 µl SuperScript II RT dazu pipettiert und gemischt. Es folgten drei Inkubationsschritte, 25°C 10 min, 42°C 50 min und 70°C 15 min. Auf Eis wurden die Proben abgekühlt und 0,5 µl RNase H (5 U/µl) wurde hinzugefügt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden bei -80°C bis zu weiteren Verwendung eingefroren.

Folgender Ansatz wurde für die Amplifikation der Munc13 Isoformen verwendet.

1 µl cDNA
 1 µl dNTPs
 1 µl forward Primer (10 pmol/µl)
 1 µl reverse Primer (10 pmol/µl)
 5 µl 10 x Taq-Puffer
 1 µl Taq
 41,5 µl ddH₂O

PCR-Zyklus

95°C	2 min		
95°C	30 sec	}	40 x
58°C	30 sec		
72°C	1 min		
72°C	7 min		
4°C	→ bis zur weiteren Verwendung		

6.7.4.2 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die real-time PCR ist eine quantitative PCR-Methode. Hierbei werden die PCR-Produkte bei jedem Zyklus markiert oder Fluoreszenz wird freigesetzt, je nachdem welche Methode benutzt wird. In dieser Arbeit wurde die SYBR-Green Methode verwendet. Das Prinzip dieser Methode ist, dass sich bei jeder Synthese von doppelsträngiger DNA Farbstoffmoleküle in die DNA einlagern können. Erst durch die Bindung des Farbstoffes kann dieser bei einer Anregung 495 nm und einer Emission von 520 nm fluoreszieren. Die Intensität der Fluoreszenz wird jeweils am Ende der Amplifikation gemessen und somit nimmt die Fluoreszenz bei jedem Zyklus zu.

Folgender Ansatz wurde für die real-time PCR eingesetzt.

1	µl cDNA
12,5	µl SYBR Green PCR Master Mix
0,5	µl forward Primer (10 pmol/µl)
0,5	µl reverse Primer (10 pmol/µl)
10,5	µl RNase freies Wasser
<hr/>	
25	µl

PCR-Zyklus

95°C	15 min	
95°C	15 sec	} 40 x
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	

Anschließend wurde eine Schmelzkurve erstellt, indem die Temperatur von 50°C auf 95°C erhöht wurde und die Fluoreszenzintensität nach jeder 0,5°C Erhöhung gemessen wurde. Dadurch trennen sich die beiden DNA-Stränge auf und die Farbstoffmoleküle werden freigesetzt. Dadurch kommt es zur Abnahme der Fluoreszenz. Aus der Kinetik dieser Fluoreszenzabnahme können Rückschlüsse auf die Qualität der DNA gezogen werden.

Für die Schmelzkurve wurde folgendes Programm gewählt:

95°C	1 min
55°C	30 sec
95°C	30 sec

6.7.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab durchgeführt.

6.7.6 Klonierung der Munc13-4-Konstrukte

Eine Klonierung ist die Einführung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor, der die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht.

6.7.6.1 Amplifizierung und Midipräparation der cDNA von Munc13-4

Für die Klonierung von Munc13-4 wurde zunächst eine Bakterien-Plattenkultur hergestellt, indem von einer gewerblich erworbene Bakterien-Schichtkultur mit einer Impföse Bakterienklone auf die Agarplatte übertragen wurde. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und nach spätestens 16 h Inkubation wurde ein Klon in 50 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin überführt. Diese Kultur wurde bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Midipräparation.

6.7.6.2 Restriktion der PCR-Fragmente und des Expressionsvektors

Um die Munc13-4 cDNA in einen Expressionsvektor einführen zu können wurde mit Hilfe von Primern die Schnittstellen *Age I* (forward) und *Bgl II* (reverse) am 5'-Ende angefügt. Sowohl das PCR-Produkt als auch der eGFP-Vektor und der mCherry-Vektor (N1-eGFP-Vektor, eGFP wurde durch mCherry ersetzt) wurden mit den

Enzymen *Age I* und *Bgl II* geschnitten. Dazu wurden 10 Units der entsprechenden Restriktionsenzyme eingesetzt, um 1 µg der PCR-DNA bzw. 3 µg der Vektor-DNA zu verdauen. Die Ansätze wurden bei 37°C mindestens 90 min verdaut. Die Vektor-DNA wurde mit dem Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) 2 h bei 37°C dephosphoryliert, damit die PCR-Fragmente, die am 5'-Ende Phosphatgruppen besitzen, in den Vektor integriert werden können. Diese Reaktion wurde mit Hitze bei 72°C 15 min inaktiviert. Anschließend wurde diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmente wurden aus dem Gel präpariert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

6.7.6.3 Ligation der restingierten PCR-Fragmente mit dem Expressionsvektor

Nach der Aufreinigung der DNA-Fragmente wurden die Konzentrationen photometrisch bestimmt und ein 20 µl Ligationsansatz angesetzt. Dazu wurden der linearisierte Vektor und die PCR-Amplifikate im Molekülverhältnis 5:1 mit einer Unit T4-DNA Ligase 4 h bei 16°C inkubiert. Für die Ligation wurde 25 ng Vektor-DNA eingesetzt und mittels folgender Formel wurde die entsprechende Menge an PCR-DNA bestimmt und eingesetzt:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} \text{ (ng)} = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} \text{ (ng)} \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} \text{ (bp)} / \text{Länge}_{\text{Vektor}} \text{ (bp)}$$

Der Ligationsansatz wurde anschließend transformiert, um die Vektor-DNA mit integriertem PCR-Fragment zu amplifizieren. Zur Kontrolle, ob tatsächlich die PCR-DNA in den Expressionsvektor aufgenommen wurde, wurde eine Minipräparation durchgeführt und anschließend restingiert und sequenziert.

6.7.7 Transfektion der Plasmide in die CD8+ T-Lymphozyten

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle. Dabei wird zwischen der transienten Transfektion, zeitweiliges Einbringen der DNA über Plasmide, und der stabilen Transfektion, dauerhafter Einbau der Fremd-DNA in das Genom unterschieden. In dieser Arbeit wurde die transiente Transfektion gewählt, um die Expressionsvektoren mit der Ziel-DNA in der Zelle zu translatieren. Dafür

wurde die Elektroporation als geeignete Methode zur Transfektion von CD8⁺ T-Lymphozyten gewählt. Für die Elektroporation wurde das Elektroporationsprotokoll für Maus CD8⁺ T-Lymphozyten von Lonza nach Angaben des Herstellers benutzt.

6.7.8 Infizierung der Chromaffinzellen mittels des Semliki-Forest-Virus

Das Prinzip der Virusherstellung erfolgte zuerst mit der Herstellung des Plasmids pSFV1 mit der gewünschten Zielsequenz. Dieses Plasmid enthält keine Sequenz, die für Strukturproteine kodieren. Dafür gibt es ein so genanntes pSVF-helper Plasmid, das für die Strukturproteine kodiert. Beide Plasmide werden mit Hilfe von Restriktionsenzyme linearisiert und die Sequenz wird in vitro in RNA transkribiert. Beide RNA-Sequenzen werden mittels Elektroporation in BHK-Zellen transfiziert, wodurch die RNA-Sequenzen in Proteinsequenzen translatiert werden. Das Virus wird in der Zelle synthetisiert und aus der Zelle transportiert, so dass das Virus im Überstand geerntet werden kann.

Bevor das Virus die Chromaffinzellen infiziert, muß dieser zuvor aktiviert werden. Dies geschieht, in dem 100 µl Chymotrypsin zu einem Virusaliquot von 450 µl und 450 µl Optimem mit 0,2% BSA pipettiert wird. Nach einer Inkubation von 40 min bei RT wird zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion 110 µl Aprotinin hinzugegeben und für 4 min bei RT inkubiert. Anschließend konnten die Chromaffinzellen mit 50 µl des Virusansatzes infiziert werden.

6.8 Gelelektrophorese Systeme

6.8.1 Agarose-Gele zur DNA-Analyse

Nach der Reaktion wurden die PCR-Produkte bzw. Restriktionsfragmente nach Länge der PCR-Fragmente auf ein 0,8 – 1,4%-iges Agarosegel (entsprechende Menge Agarose mit 50 ml 1 x Tris(hydroxymethyl-)aminomethanazetat EDTA (TAE)-Puffer (0,8 mM Tris Base, 0,4 mM Eis-Essig, 0,02 mM EDTA bei pH 8,0)) zur Kontrolle aufgetragen, dabei wurden die Proben mit Loading-Puffer (500 µl 80% Glycerin, 20 µl 50 x TAE, 20 µl Xylencyanol ad 1 ml A. dest) 10:1 versetzt. Die

Gelelektrophorese wurde in 1 x TAE-Puffer und bei einer Spannung von 50 – 70 Volt durchgeführt.

6.8.2 Formaldehyd (FA) -Agarosegele zur Auftrennung isolierter Gesamt-RNA

Für die Kontrolle der Isolation der Gesamt-RNA wurde die RNA mittels eines Formaldehyd-Agarosegels aufgetrennt, um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA zu vermeiden, die das Laufverhalten beeinflussen können.

1,2 % Formaldehyd-Agarosegel	DEPC-H ₂ O	45	ml
	10 x FA-Puffer	5	ml
	Agarose	0,6	g

6.8.3 SDS-Polyacrylamidgelle zur Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen, in diesem Fall Proteine, im elektrischen Feld in einer Lösung oder Trägmatrix. Die verschiedenen Proteine wandern in schmalen einzelnen Banden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, da die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins von der Molekülgröße und von der Nettoladung des Moleküls abhängig ist. Damit alle Proteine in eine Richtung wandern, werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. SDS verbindet sich mit den Proteinen zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Masse zu Ladungsverhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1%-iger SDS-Lösung). SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), so dass die Moleküle eine mehr oder weniger einheitliche Form annehmen.

Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurde ein 4 – 12%-iges oder ein 10%-iges Gel (Invitrogen) verwendet. Die Proteine wurden bei 150 V über 75 - 120 min aufgetrennt.

Gelelektrophoreselaufpuffer 1 x NuPage MOPS SDS running Buffer

7. Ergebnisse

7.1 Charakterisierung der isolierten Splenozyten und CD8+ T-Lymphozyten

7.1.1 Vergleich der Splenozyten und CD8+ T-Lymphozytenpopulation in WT und Munc13-4-KO Mäusen

Die Milz ist ein Teil des lymphatischen Gewebes und besteht vorwiegend aus Lymphozyten (60 – 80%). Die Milz dient der Proliferation der Lymphozyten, ist Speicherort für Monozyten und sondert alte Erythrozyten ab. Da die Milz vorwiegend aus Lymphozyten besteht, eignet sie sich sehr gut für die Isolierung der CD8+ T-Lymphozyten. In dieser Arbeit wurden die CD8+ T-Lymphozyten ausschließlich aus der Milz von 6 - 9 Wochen alte WT- und Munc13-4-KO Mäusen gewonnen. Zunächst wurde die Anzahl der Splenozyten und die Anzahl der CD8+ T-Lymphozyten aus beiden Mausstämmen untersucht (Abb. 11).

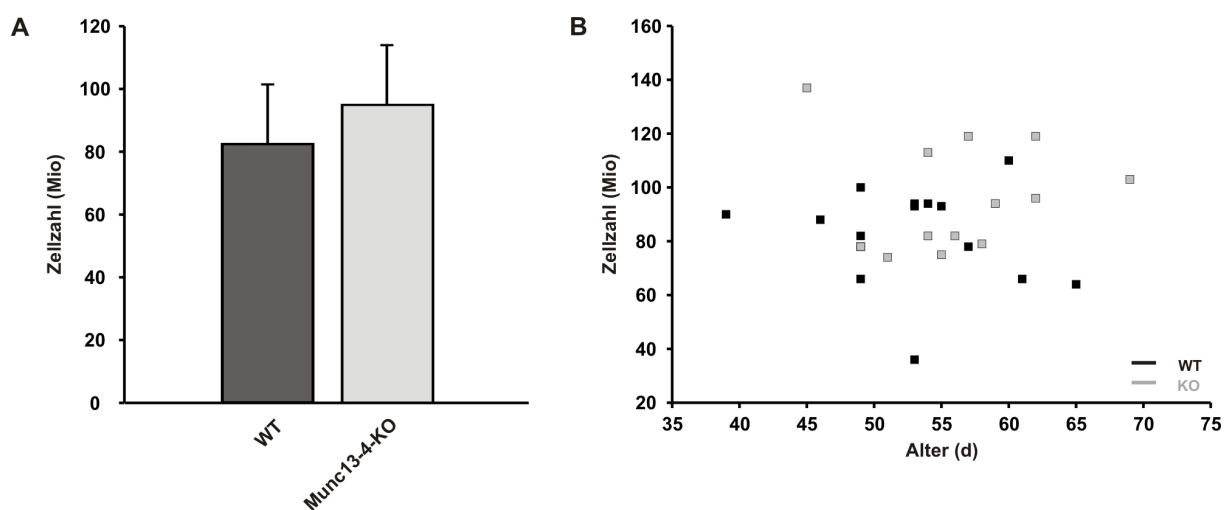


Abb. 11: Vergleich der Splenozyten zwischen WT und Munc13-4-KO.

A. Bestimmung der Milzzellen mittels Neubauer-Zählkammer nach Isolation. B. Milzzellanzahl in Abhängigkeit vom Alter. (N=14; \pm SD)

Die Splenozyten wurden nach der Isolation mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Aus Abb. 11 ist zu erkennen, dass sowohl die Anzahl der Splenozyten als auch die Verteilung der Zellanzahl, die auf das Alter der Tiere bezogen ist, nicht signifikant verändert ist. Im Durchschnitt sind aus einer Milz $82,4 \times 10^6$ ($SD \pm 19 \times 10^6$) aus WT-Mäusen und $94,9 \times 10^6$ ($SD \pm 20,2 \times 10^6$) Zellen aus Munc13-4 KO Mäusen isoliert

worden. Im Vergleich zu den WT Zellen weisen die Munc13-4-KO Zellen keine signifikante Erhöhung auf, was daraufhin deutet, dass die Munc13-4-KO Mäuse keine Hyperplasie der Milz unter semisteriler Haltung entwickeln.

Die CD8⁺ T-Lymphozyten wurden mit Hilfe des CD8⁺-DynaIsolationskit von Invitrogen aus den Splenozyten isoliert und anschließend wurde die Anzahl der unstimulierten CD8⁺ T-Lymphozyten untersucht.

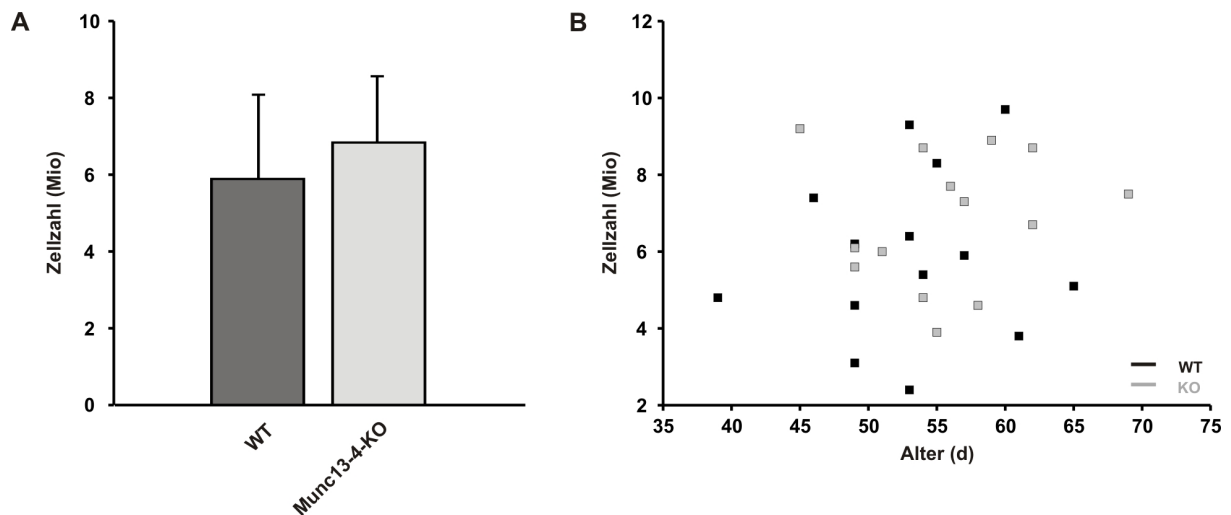


Abb. 12: Vergleich der CD8⁺ T-Lymphozytenpopulation zwischen WT und Munc13-4-KO.

A. CD8⁺ T-Lymphozytenanzahl Isolation mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. B. CD8⁺ T-Lymphozytenanzahl in Abhängigkeit vom Alter (N=14; ± SD).

Nach Isolation wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Aus den WT Splenozyten konnten im Durchschnitt $5,9 \times 10^6$ (SD $\pm 2,1 \times 10^6$) und aus Munc13-4-KO Splenozyten $6,8 \times 10^6$ (SD $\pm 1,7 \times 10^6$) CD8⁺ T-Lymphozyten gewonnen werden (Abb. 12). Daraus ergibt sich, dass auch die CD8⁺ T-Lymphozytenpopulation in der Milz der Munc13-4-KO Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen unverändert ist. Dies bedeutet, dass keine Stimulation und somit auch keine Proliferation der CD8⁺ T-Lymphozyten in den Munc13-4-KO Mäusen ausgelöst wurde.

7.1.2 Nachahmung der physiologischen Stimulation von CD8+ T-Lymphozyten durch anti-CD3/CD28 Beadstimulation

CTLs werden aktiviert indem sie APCs erkennen und mit dem MHC I Molekül den TCR binden. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die dazu führt, dass die CTLs proliferieren, um die Pathogene im Organismus abzutöten. Aber auch Zytokine stimulieren die Zellen zur Proliferation. Deshalb schütten aktivierte CTLs IL-2 aus, um autokrin und parakrin diese zu stimulieren. Die Zellproliferation spielt eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der Pathogene. Je mehr CTLs gegen das Pathogen spezifisch vorhanden sind, desto schneller können die Pathogene bekämpft werden. Nachdem die Pathogene abgetötet sind, wird die erhöhte Anzahl der CTLs, die für das Pathogen spezifisch sind, nicht mehr gebraucht und werden deshalb wieder reduziert. Um die Aktivierung *in vitro* zu simulieren, werden die unstimulierten CD8+ T-Lymphozyten, die aus der Milz gewonnen wurden, mit anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Beads inkubiert. Die anti-CD3 Antikörper interagieren mit dem CD3-Molekül, das ein Bestandteil des TCR-Komplexes ist. Der anti-CD28 Antikörper bindet an das Oberflächenprotein CD28, das eine kostimulatorische Wirkung auf die Stimulation besitzt. Zusätzlich wurde IL-2 zu den CD8+ T-Lymphozyten dazugegeben, um die physiologische Wirkung von Zytokinen zu simulieren. Die Zellproliferation wurde durch die Ermittlung der Zellanzahl nach 0, 24 h, 48 h, 72 h, und 96 h nach Stimulation gezählt und graphisch dargestellt (Abb. 13).

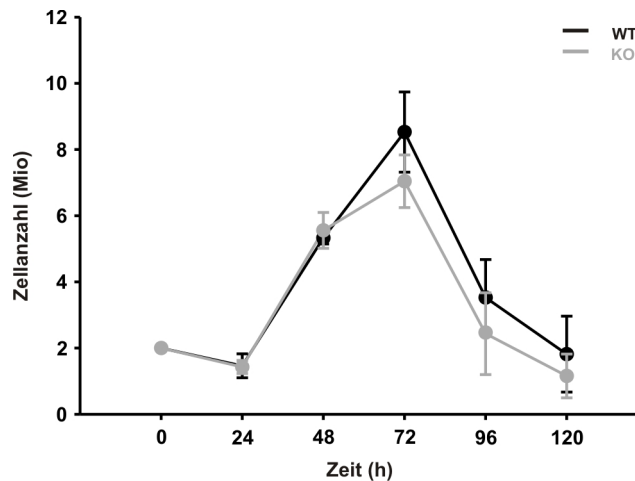


Abb. 13: Proliferation der CD8+ T-Lymphozyten der WT und Munc13-4-KO Mäuse

Die CD8+ T-Lymphozyten wurden isoliert und mit der gleichen Anzahl von anti-CD3/CD28 Beads und 50 U/ml aktiviert. Die Zellen wurden direkt nach der Isolation, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h gezählt (N = 5, n = 8; ± SD).

Nach 24 h ist zunächst eine Abnahmen der Zellzahl zu verzeichnen, was auf ein Absterben der Zellen, die bei der Isolation geschädigt wurden, zurückzuführen ist. Danach beginnt die Proliferationsphase und die Zellzahl steigt bis zum Zeitpunkt 72 h nach Stimulation an und anschließend geht die CD8+ T-Lymphozytenpopulation zurück. Für die folgenden Versuche wurden die CD8+ T-Lymphozyten nach 72 h Stimulation aufgrund der höchsten Proliferationsrate zu diesem Zeitpunkt verwendet.

7.1.3 Analyse der Funktionalität von Ionenkanälen und Kalziumspeichern anhand von Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_{cyt}$

Um die Qualität der Zellen nach Isolation und Stimulation beurteilen zu können, wurde die Kinetik der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Stimulation untersucht. Es ist zu erwarten, dass nachdem die TCR entweder durch Bindung von MHC I-Molekülen einer APC (das wäre der physiologische Weg) oder durch Interaktion eines anti-CD3 Antikörpers mit dem TCR-Komplex aktiviert werden, zu einer schnellen intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung durch die Entleerung intrazellulären Kalziumspeicher kommt. Durch die Entleerung der Speicher werden sogenannte CRAC-Kanäle in der Plasmamembran geöffnet. Dadurch kommt es zu einem lang anhaltenden Kalziumeinstrom, der für das sogenannte Kalziumplateau verantwortlich ist (Lyubchenko et al., 2001).

Aufgrund der intrazellulären Kalziumkonzentrationsmessungen kann also eine Aussage über die Funktionalität der Kanäle der CD8+ T-Lymphozyten getroffen werden. Deshalb wurden Deckgläser mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper beschichtet und nach 72 h wurden die stimulierte Zellen mit Fura-2 AM beladen. Nachdem die Zellen auf das Deckglas abgesunken waren und mit den Antikörpern interagieren konnten, kam es zu einem steilen intrazellulären Kalziumanstieg. Dieser fiel nach kurzer Zeit auf ein Plateau ab. Zur Eichung der Signale wurde 1 μM Ionomycin und 10 mM CaCl_2 hinzugegeben. Dadurch kam es zu einem weiteren schnellen Kalziumkonzentrationsanstieg (Abb. 14).

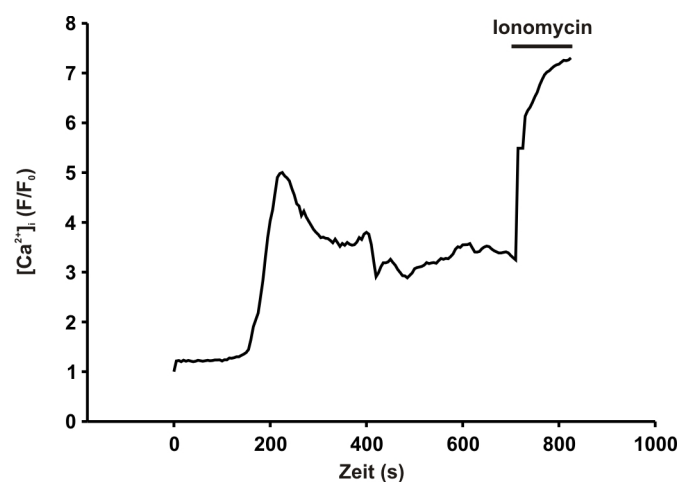


Abb. 14: Intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung nach Bildung einer IS

CD8+ T-Lymphozyten trifft auf ein anti-CD3/CD28 Antikörper beschichtetes Deckglas und löst durch die Signalkaskade einen Kalziueinstrom aus.

Durch diesen Versuch ist gezeigt worden, dass die Funktion der Kalziumspeicherentleerung und die Funktionalität der Kalziumkanäle erhalten blieb und somit die Zellen nach der Isolation und Stimulation funktionell normal reagierten.

7.2 Transkription und Expression von Munc13 Isoformen

7.2.1 Expression von Munc13-4 in verschiedenen Geweben

Koch et al. beschrieben zum ersten Mal das Protein Munc13-4 als eine Isoform der Munc13 Familie und konnten das Protein in Lunge und Milz der Ratte mittels Western Blot nachweisen. Allerdings wurde im Northern Blot, also auf mRNA Ebene,

Munc13-4 in mehrere Gewebe nachgewiesen, wie Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Niere und Testis. Die stärkste Transkription ist in Lunge, Milz und Testis zu sehen. Um Munc13-4 in Maus-Gewebe nachweisen zu können, wurde ein Antikörper gegen den C-Terminus von mMunc13-4 generiert und aufgereinigt. Für den Nachweis von Munc13-4 in verschiedene Gewebe, wurden die entsprechenden Organe der Maus präpariert und lysiert. Folgende Organe wurden für den Western Blot eingesetzt: Auge, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Nebenniere, Dünndarm, Muskel und Testis. Eine starke Expression zeigten die Organe Lunge und Milz. Eine leichte Bande war in Testis nach einer längeren Belichtungszeit des Blots zu erkennen (Abb. 15).

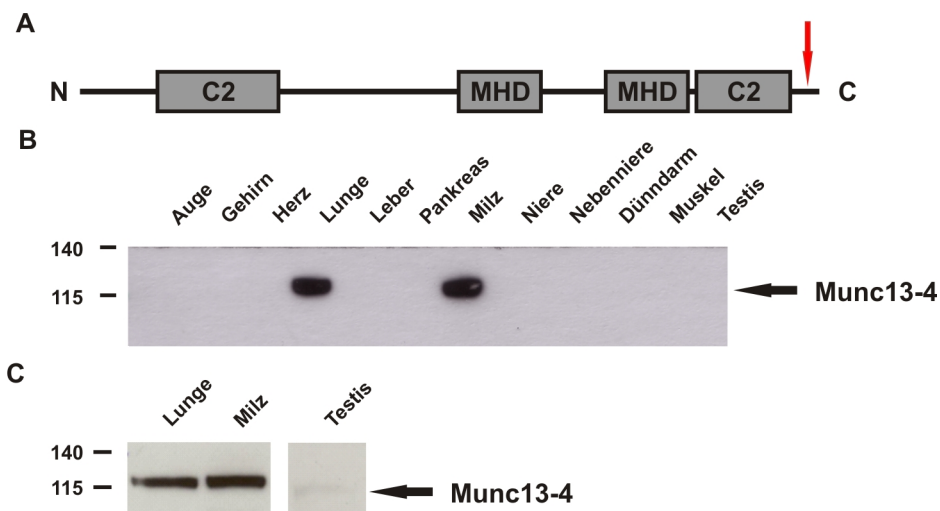


Abb. 15: Western Blot Analyse von Munc13-4 in verschiedenen Organen

A. Model der Domänen von Munc13-4 und die Epitoposition des Munc13-4 Antikörpers. B. Jeweils 20 µg Proteinlysate von den verschiedenen Organen wurde auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosmembran übertragen. Munc13-4 Expressionsnachweis in Lunge und Milz. C. 20 µg Proteinlysate von Lunge, Milz und Testis wurden auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosmembran geblottet. Der Nachweis von Munc13-4 in Testis ist als leichte Bande zu erkennen.

7.2.2 Transkription von Munc13 Isoformen in CD8+ T-Lymphozyten

Bisher wurde nur Munc13-4 in den CTL und anderen Blutzellen nachgewiesen. Es stellte sich die Frage, ob auch andere Munc13 Isoformen in den CTL exprimiert und somit eine Rolle bezüglich der Exozytose spielen könnten. Dazu wurde mRNA aus

CD8+ T-Lymphozyten und Gehirn gewonnen und diese in cDNA umgeschrieben. Die Isoformen wurden mittels spezifischer Primer detektiert, dabei diente die cDNA basierenden auf der mRNA aus dem Gehirn als Positivkontrolle für Munc13-1, ubMunc13-2, bMunc13-2 und Munc13-3 (Abb. 4.6).

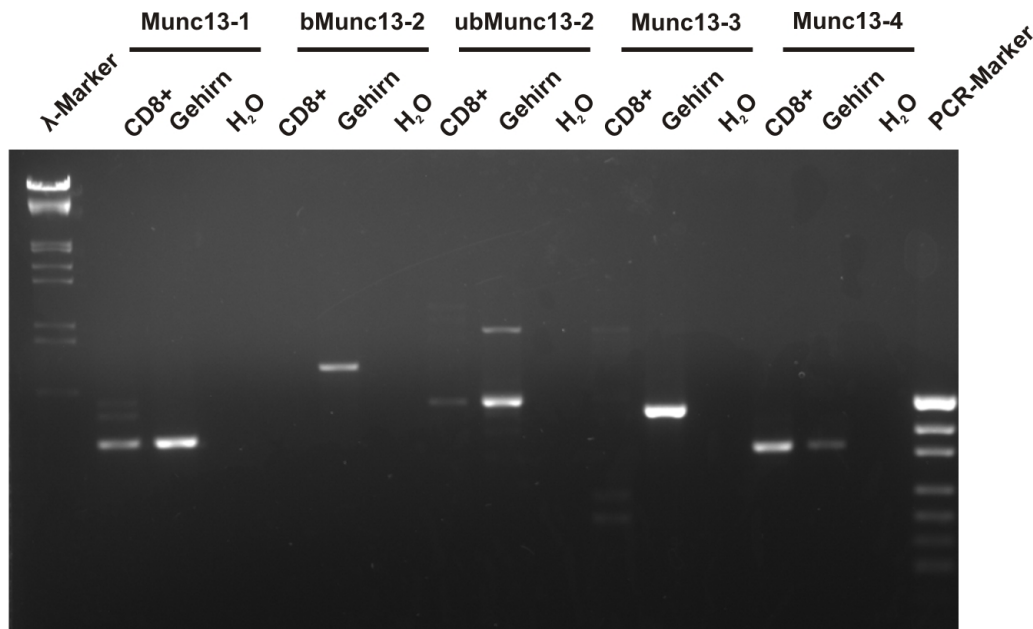


Abb. 16: Munc13 Isoform Transkriptionsanalysen von CD8+ T-Lymphozyten und Gehirn

Die cDNA von CD8+ T-Lymphozyten und Gehirn wurden in eine PCR mit spezifischen Primern für die verschiedenen Munc13 Isoformen eingesetzt. PCR-Fragmentgrößen waren wie folgt: Munc13-1 390 bp, bMunc13-2 635 bp, ubMunc13-2 498 bp, Munc13-3 465 bp und Munc13-4 345 bp.

In der Abb. 16 kann man erkennen, dass alle Munc13 Isoformen im Gehirn auf mRNA-Ebene vorliegen. Im Gegensatz dazu können nur die Isoformen Munc13-1, ubMunc13-2 und Munc13-4 in den CD8+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Allerdings ist nur eine schwache Bande von ubMunc13-2 zu erkennen. Deshalb wurde zunächst der Fokus der Forschung auf Munc13-1 gelegt.

7.2.2.1 Quantitativer mRNA-Nachweis von Munc13-1 und Munc13-4

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, ist neben Munc13-4 auch Munc13-1 und ubMunc13-2 in CD8+ T-Lymphozyten transkribiert. Da Munc13-1 bereits schon im neuronalem System näher charakterisiert worden ist, wurde diese Isoform für die nähere Untersuchung in den CD8+ T-Lymphozyten ausgewählt. Um die Menge der mRNA

von Munc13-1 und Munc13-4 relativ zu einander zu quantifizieren, wurde eine real-time PCR durchgeführt, wobei als Referenzgen das Glucoronidase B Gen gewählt wurde. Aus Abb. 17 kann man entnehmen, dass sich die mRNA-Konzentration beider Gene sich nicht signifikant unterscheiden.

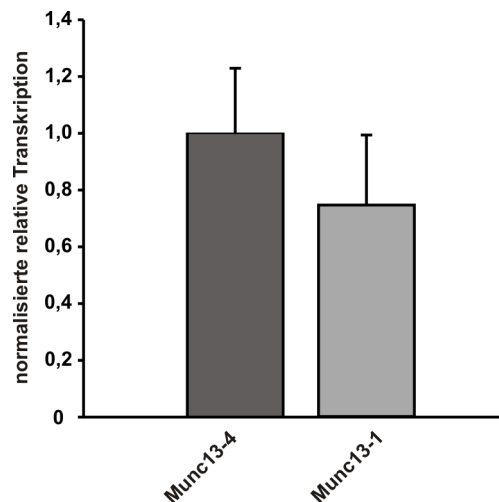


Abb. 17: Quantitativer mRNA-Nachweis von Munc13-1 und Munc13-4 in CD8+ T-Lymphozyten

Aus CD8+ T-Lymphozyten wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit dem Farbstoff SYBR® Green kann die Menge PCR-Produkte anhand der Fluoreszenzsignale berechnet werden. Die Transkriptionsrate des Zielgens und des Haushaltsgens werden ins Verhältnis gesetzt und nach der Normalisierung kann die relative Transkriptionsrate der Zielgene mit einander verglichen werden (N = 3, n = 5; ± SEM).

Nachdem die Konzentration der mRNA von Munc13-1 im Vergleich zu Munc13-4 nur tendenziell geringer nachgewiesen wurde, sollte nun der Nachweis von Munc13-1 auf Proteinebene in den CD8+ T-Lymphozyten untersucht werden.

7.2.3 Munc13-1 und Munc13-4 in CD8+ T-Lymphozyten

7.2.3.1 Expression von Munc13-1 in CD8+ T-Lymphozyten

Nachdem auf mRNA-Ebene Munc13-1 nachgewiesen werden konnte und zwar fast im gleichen Maße wie Munc13-4 (real-time PCR), kam die Frage auf, ob Munc13-1 auch im gleichen Maß wie Munc13-4 translatiert wird und funktionell in den CTLs funktionell ist. Deshalb wurden Western Blot Analysen mit CD8+ T-Lymphozyten aus WT und Munc13-4-KO Mäusen durchgeführt. Als Kontrollen wurden BHK-Zellen, die

entweder nicht infiziert wurden oder mit Munc13-1-eGFP infiziert wurden, benutzt. Zusätzlich wurde als endogene Positivkontrolle Gehirnlysate benutzt.

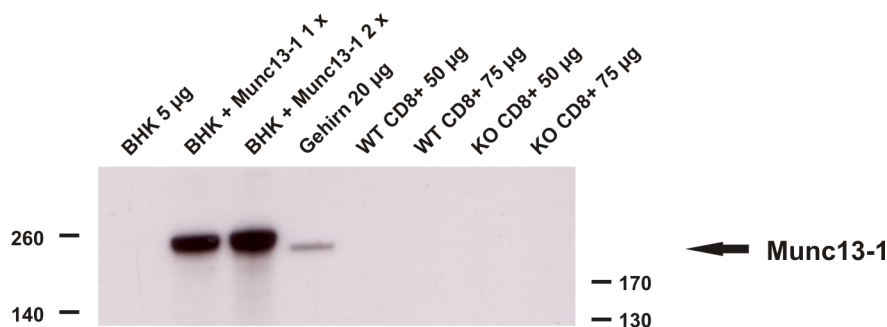


Abb. 18: Munc13-1 Proteinexpression

Proteinlysatkonzentrationen, wie angegeben wurde auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Die Abb. 18 zeigt nur bei den Positivkontrollen eine deutliche Bande, aber in den CD8⁺ T-Lymphozyten obwohl eine höhere Proteinkonzentration aufgetragen wurde, kann auch nach längerer Belichtung kein Protein nachgewiesen werden. Daraus kann man schließen, dass entweder der Antikörper eine nur geringe Affinität zum Epitop aufweist und somit das Protein, das eventuell nur in sehr geringen Mengen synthetisiert wird, nicht detektierbar ist. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass tatsächlich nur die mRNA transkribiert ist und diese nicht translatiert wird.

7.2.3.2 Expression und Regulation von Munc13-4 in CD8⁺ T-Lymphozyten

Damit aus unstimulierten CTL Effektorzellen werden, müssen diese über mehrere Tage stimuliert werden. Dabei verändern sich der Metabolismus und die Morphologie der Zellen und dadurch auch ihre Funktion. Die Funktion der CTL Effektorzellen ist es, APCs abzutöten. Dazu müssen die spezialisierten Proteine, die für diese Funktion wichtig sind, wie die zytotoxischen Proteine, ebenfalls hochreguliert werden. Dabei stellte sich die Frage, ob Munc13-4, vermutlich für das Priming der lytischen Granulen verantwortlich ist, auch hochreguliert wird. Dazu wurde Munc13-4 in CD8⁺ T-Lymphozyten direkt nach der Isolation, nach einem, zwei und drei Tage Stimulation mittels Western Blot nachgewiesen. Um das Expressionslevel der verschiedenen lang

stimulierten CD8⁺ T-Lymphozyten zu vergleichen, wurde von jedem Proteinlysatsat 20 µg aufgetragen (Abb. 19) und densitometrisch analysiert.

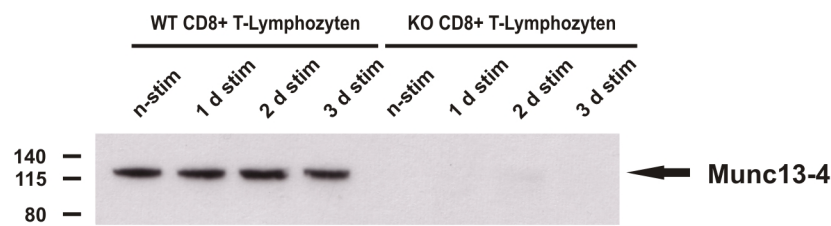


Abb. 19: Munc13-4 Expression in WT und Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten

Detektion der Munc13-4 Expression von nicht-stimulierten, 1 d, 2 d und 3d stimulierten CD8⁺ T-Lymphozyten. Dafür wurden jeweils 20 µg Proteinlysatsat auf ein 10% SDS-Acrylamidgel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Wie aus der Abb. 19 zu entnehmen ist, ist das Expressionslevel von Munc13-4 in WT CD8⁺ T-Lymphozyten nach verschiedenen Stimulationszeiten unverändert. Dies bedeutet, dass die Stimulation keinen Einfluss auf die Expression von Munc13-4 hat und somit konstitutiv synthetisiert wird. Als Nachweis für die Spezifität des Antikörpers wurden Proteinlysate von Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten im Western Blot eingesetzt. Da keine Banden detektiert werden, bedeutet dies, dass der Antikörper sehr spezifisch für das Protein Munc13-4 ist.

7.2.3.3 Lokalisation von Munc13-4 in CD8⁺ T-Lymphozyten

Der Primingfaktor Munc13-4 bereitet die lytischen Granulen auf die Fusion mit der Plasmamembran vor und interagiert entweder direkt oder über ein Proteinkomplex mit der Membran der lytischen Granulen. Feldmann et al. (2003) und Menager et al. (2007) konnten bereits zeigen, dass in humanen CTL im Ruhezustand Munc13-4 vesikulär in der Zelle lokalisiert ist und nicht mit den lytischen Granulen kolokalisiert ist. Um die Lokalisation von Munc13-4 in CTL aus Maus zu bestimmen, konnte der generierte anti-Munc13-4 Antikörper nicht benutzt werden, da dieser unspezifische Bindungen in Immunfärbungen aufwies. Deshalb wurden die Zellen mit einem Plasmid mit der Sequenz von Munc13-4 und einem fusionierten Fluorophor transfiziert. 10 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit dem hochauflösenden Mikroskop analysiert.

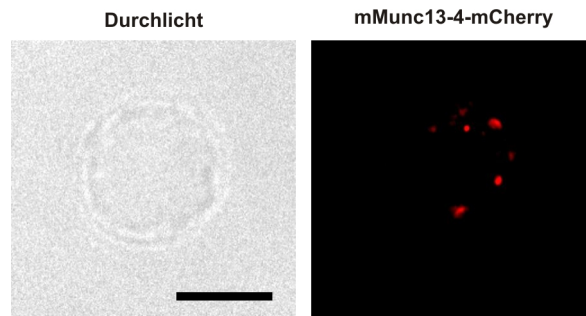


Abb. 20: Lokalisation von Munc13-4 im Ruhezustand

Die CD8⁺ T-Lymphozyten wurden nach 3 Tagen Stimulation mit anti-CD3/CD28 beschichteten Beads mit mMunc13-4 transfiziert. Nach 10 h Stunden wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit dem hochauflösenden Mikroskop analysiert (Maßstab 5 µm).

Das Konstrukt wurde zunächst in HEK-Zellen überexprimiert und anschließend im Western Blot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Munc13-4 in den HEK-Zellen translatiert wird und der generierte Antikörper das Protein spezifisch bindet (Ergebnis nicht gezeigt). Anschließend wurden die in CD8⁺ T-Lymphozyten mit diesem Konstrukt transfiziert. In Abb. 20 ist zu erkennen, dass Munc13-4 10 h nach der Transfektion vesikulär in der Zelle lokalisiert ist. Nach längeren Inkubationszeiten ist Munc13-4 zusätzlich auch an der Membran lokalisiert.

Da bisher kein Antikörper gegen Perforin bzw. Granzym B der Spezies Maus, der eine spezifische Bindung in der Immunfärbung aufweist, im Labor etabliert wurde, wurden für Kolokalisationsstudien entweder ein Perforin oder Granzym B Konstrukt mit einem Fluorophor benutzt. Die Translation dieser Konstrukte war allerdings erst nach frühestens 6 - 8 h vollzogen, so dass die Kolokalisation von Munc13-4 und einem zytotoxischen Proteinen nur bedingt untersucht werden konnte. Für die Untersuchung an der IS wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten mit dem Fusionskonstrukten Munc13-4-eGFP und Perforin-mCherry kotransfiziert. Nach 8 h Stunden wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten mit Zellen der Zelllinie P815 und einem anti-CD3 Antikörper für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe des SIMs analysiert.

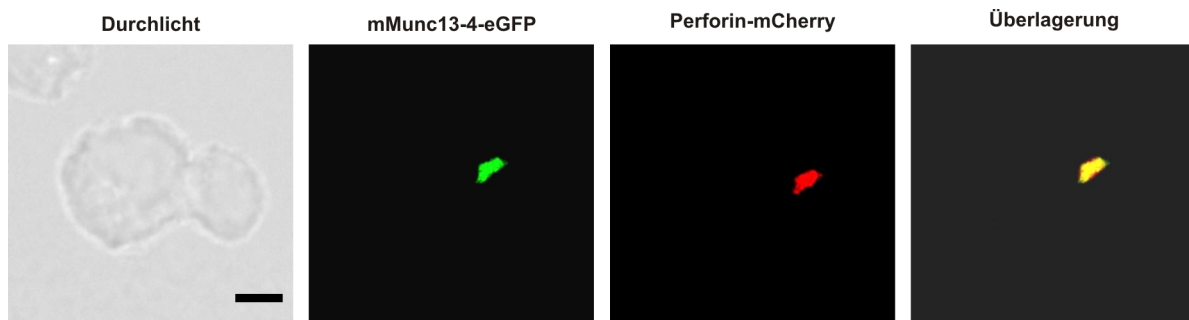


Abb. 21: Kolokalisation von Munc13-4 und Perforin

CD8+ T-Lymphozyten wurden nach 2,5 d Stimulation mit mPerforin-mCherry und mMunc13-4-eGFP transfiziert. Nach 12 h Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe von Paraformaldehyd fixiert und analysiert (Maßstab 5 µm).

Nach Ausbildung der IS folgt eine Translokation von lytischen Granulen zur IS. Da Munc13-4 für die Fusionskompetenz der lytischen Granulen verantwortlich ist, wird Munc13-4 an die Plasmamembran transloziert. In Abb. 21 ist zu erkennen, dass Munc13-4 mit den lytischen Granulen an der IS kolokalisiert ist. Somit kann Munc13-4 über Interaktion von Proteinen, die mit den lytischen Granulen interagieren, die lytischen Granulen primen bzw. auf die Fusion vorbereiten.

7.3 Charakterisierung der immunologischen Synapse

7.3.1 CD3-Verteilung in CD8+ T-Lymphozyten

CD3 ist ein Oberflächenmolekül, das mit dem TCR einen Komplex bildet und mit Hilfe des MHC I das Antigen erkennt und bindet. Während der Bildung der IS akkumulieren CD3 und der TCR im Bereich der Kontaktstelle (Wiedemann et al., 2006). Diese Akkumulation ist ein Zeichen für die Bildung der IS.

Um zu untersuchen, ob sich die Munc13-4-KO T-Zellen bezüglich der Bildung der IS anders verhalten als WT T-Zellen, wurden die CD8+ T-Lymphozyten mit anti-CD3 Antikörpern gefärbt und am SIM analysiert. Dazu wurden die CD8+ T-Lymphozyten mit APCs inkubiert, wodurch eine intrazelluläre Signalweitergabe nach der Erkennung der APC erfolgt. Dabei werden die CD3-Moleküle zur Kontaktstelle rekrutiert.

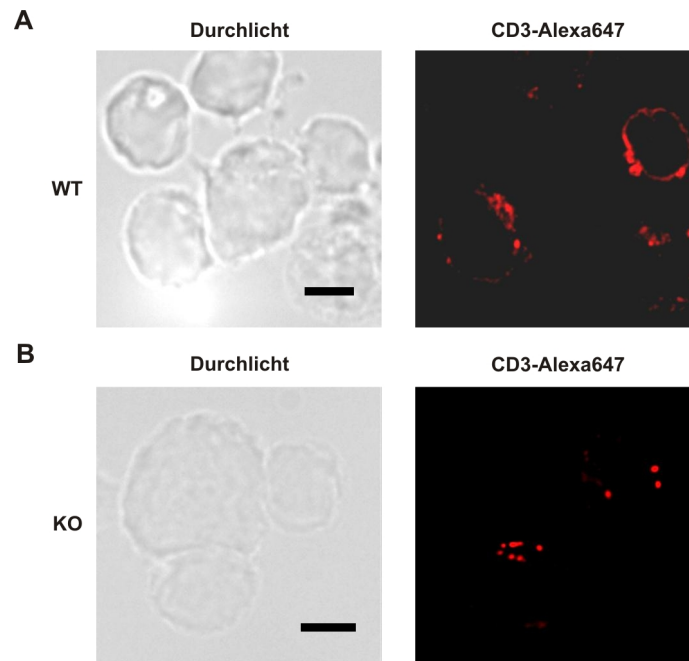


Abb. 22: CD3-Akkumulation an der Kontaktstelle zwischen T-Zellen und APCs

T-Zellen wurden nach 3 d Stimulation mit dem Alexa647 gekoppelten anti-CD3 Antikörper 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit der gleichen Anzahl an P815 Zellen und 1 µg/ml anti-CD3 (zur Bildung von Konjugaten) auf ein Deckglas pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Die Präparate wurden mit dem SIM analysiert (Maßstab 5 µm).

In Abb 20 kann man erkennen, dass sowohl die WT T-Zellen als auch die KO T-Zellen eine CD3 Akkumulation an der Kontaktzone zur APC zeigen. Somit ist gezeigt worden, dass Munc13-4 keinen Einfluss auf die Rekrutierung von CD3-Endosomen besitzt. Die Ausbildung der Synapse kann physiologisch in den Munc13-4-KO CTLs ablaufen.

CD3 Rekrutierung ist nur ein Zeichen der IS-Bildung. Ein weiteres Anzeichen ist die Umorganisation von Strukturproteinen, wie Aktin und Mikrotubuli. Deshalb wurde die Organisation von α -Tubulin in den T-Zellen nach Simulierung der IS mit einer Antikörperfärbung untersucht.

7.3.2 α -Tubulin-Lokalisation nach Ausbildung der IS mittels anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen

Bei der Ausbildung der IS verändern sich auch morphologische Strukturen der Zelle, so verlagert sich das Mikrotubuliorganisationszentrum zur IS hin. Von diesem Zentrum gehen Mikrotubuli weg, die bis zur gegenüberliegenden Membran führen. Die Zelle besitzt somit ein Leitungssystem an dem Proteine und Vesikel zur IS transportiert werden können. Die Verlagerung des Mikrotubuliorganisationszentrums und die Umbildung des Mikrotubulinetzwerks ist ein früher Schritt der IS-Bildung.

Um zu untersuchen, ob die Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten eine funktionelle IS ausbilden können, wurde α -Tubulin nach Inkubation der T-Zellen auf anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen angefärbt.

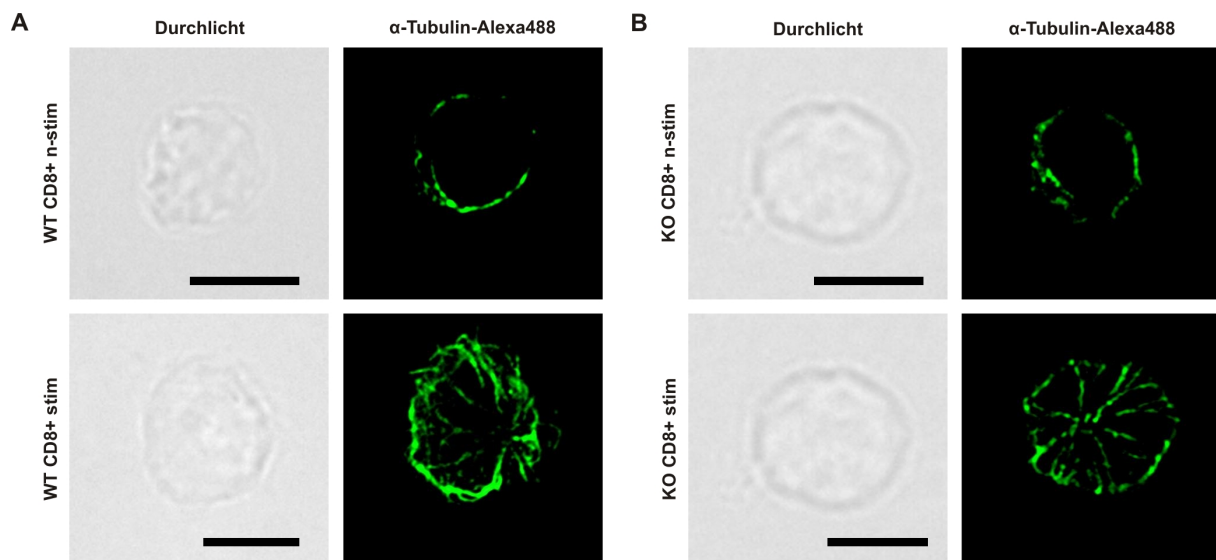


Abb. 23: α -Tubulin Anordnung im Bereich der IS

3 d stimulierte WT CD8⁺ T-Lymphozyten (A) oder Munc13-4-KO T-Lymphozyten (B) wurden entweder auf Poly-L-Ornithin beschichteten Deckgläschen (obere Abbildung) als Kontrolle oder auf anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen (untere Abbildung) für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti- α -Tubulin Antikörper angefärbt. Die Analyse der Färbung wurde mit dem SIM durchgeführt (Maßstab 5 μ m).

Anhand der Abb. 23 kann gezeigt werden, dass sowohl in der IS von WT als auch Munc13-4-KO T-Zellen nach 20 min Inkubation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern des Mikrotubulinetzwerks im Bereich der Kontaktzone umstrukturiert wird. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Munc13-4 nicht im Zusammenhang mit der Verlagerung des Mikrotubuliorganisationszentrums steht.

7.4 Untersuchung der Sekretionsereignisse in CTLs

7.4.1 Analyse der Sekretion von Granzym B

Nach Ausbildung der IS werden die lytischen Granulen zur Kontaktzone transportiert, mittels der SNARE-Proteine auf die Fusion vorbereitet und schließlich sezerniert. Es besteht die Hypothese, dass Munc13-4 verantwortlich für das Priming der lytischen Granulen sein könnte.

Um herauszufinden, ob Munc13-4 an dem Fusionsprozess tatsächlich und in welchem Maße beteiligt ist, wurden die CTLs auf ihre Sekretionsleistung der lytischen Granulen mittels eines Granzym B ELISAs untersucht. Dazu wurden die CTLs mit anti-CD3/CD28 beschichteten Beads, die APCs repräsentieren, stimuliert. Da die Sekretion ein dynamischer Prozess darstellt, wird mehr Granzym B sezerniert je länger die Stimulation anhält. Um dies zu beweisen wurden Überstände nach 1 h und nach 4 h Restimulation entnommen und analysiert. Um nicht nur die absolute Konzentration im Überstand zu messen, sondern auf die Sekretionsleistung der Zelle schließen zu können, wurde die Gesamtkonzentration von Granzym B, bestehend aus der Konzentration im Überstand als auch der Konzentration, die in den Zellen enthaltend ist, ermittelt. Anhand der Gesamtkonzentrationen lässt sich auch die Syntheserate von Granzym B errechnen. Des Weiteren kann die sezernierte Granzym B Konzentration auf die Gesamtkonzentration bezogen werden und somit eine Aussage auf die Sekretionsmenge in Abhängigkeit zur Synthese zu treffen. Außerdem lassen sich Variabilitäten der unterschiedlichen Stimulationsstadien der Zellen von Experiment zu Experiment dadurch ausschließen.

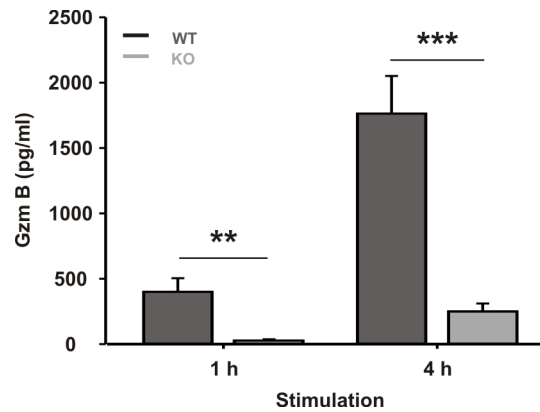


Abb. 24: Sekretion von Granzym B in WT und Munc13-4-KO CTL nach Restimulation

Die CTL wurden mit anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Beads für 1 h oder 4 h restimuliert. Überstand und Gesamtkonzentration von Granzym B wurde mittels ELISA gemessen und die Sekretion der konstitutiven und der stimulierten Sekretion wurde auf die Gesamtkonzentration bezogen. Anschließend wurde die induzierte Sekretion nach Subtraktion der konstitutiven Sekretion errechnet (N = 5, n = 5; \pm SEM; Student's T-Test: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Nach 1 h Restimulation konnte eine drastische Reduktion der Sekretion in den Munc13-4KO CTLs verzeichnet werden (Abb. 24). So sezernierten WT CTLs eine Granzym B Konzentration von 399,79 pg/ml (\pm 104,4 pg/ml SEM), im Gegensatz dazu sezernierten die Munc13-4-KO CTLs nur 26,7 pg/ml (\pm 9,89 pg/ml SEM). Da nach einer längeren Restimulation vermehrt Granzym B ausgeschieden wird, konnte eine noch drastischere Reduktion der Sekretion in den Munc13-4-KO CTLs anhand der Konzentration ermittelt werden. Während die WT CTLs 1763,27 pg/ml (\pm 288,04 pg/ml SEM) sezernierten, konnte bei den Munc13-4-KO CTLs nur eine Konzentration von 249,55 pg/ml (\pm 60,5 pg/ml) nach 4 h Restimulation gemessen werden. Somit konnte anhand der WT CTLs gezeigt werden, dass nach einer längeren Restimulationszeit tatsächlich vermehrt lytische Granulen sezerniert werden. Da sowohl nach 1 h als auch nach 4 h Restimulation die Munc13-4-KO CTLs Granzym B sezernierten, spricht dies entweder für eine konstitutive Sekretion oder für eine teilweise, wenn auch nur sehr geringe Kompensation des Sekretionsdefizits in Munc13-4-KO CTLs.

Jedoch kann das Sekretionsdefizit der Munc13-4-KO CTLs nicht auf unterschiedliche Syntheseraten von Granzym B im Vergleich zu den WT CTL zurückgeführt werden, da die Gesamtkonzentration von Granzym B keine signifikante Konzentrationsänderung aufwies. Dennoch konnte gezeigt werden, dass nach 4 h Restimulation vermehrt Granzym B synthetisiert wurde. Allerdings ist die Granzym B Konzentration

schon zu Beginn des Versuches relativ hoch, so dass nur eine geringe Konzentration an Granzym B während der Experimentdauer synthetisiert wurde. Dies bedeutet auch, dass die Sekretionsrate nicht mit der Syntheserate korreliert. Dies lässt den Schluss zu, dass nach 3 Tagen Stimulation die Granzym B Konzentration für die Abtötung der APCs ausreichend ist und durch die Restimulation die gerichtete Sekretion von Granzym B getriggert wird.

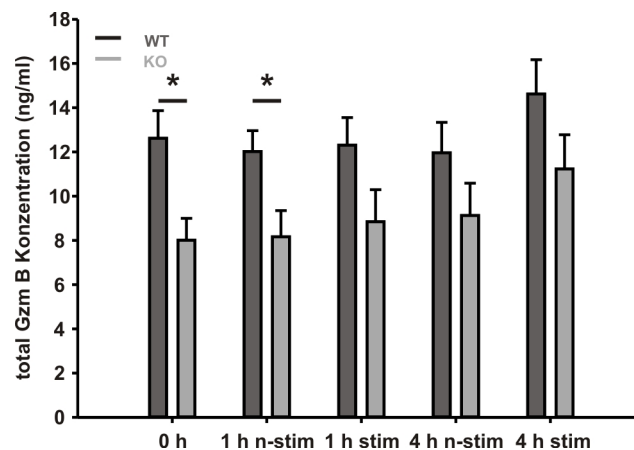


Abb. 25: Totalkonzentration von Granzym B

Die Gesamtkonzentration von Granzym B wurde durch lysieren der CTLs nach 0 h, 1 h und 4 h nach Stimulation oder ohne Stimulation gemessen (N = 5, n =5; \pm SEM; Student's T-Test: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

7.4.2 Analyse der Sekretion von Lysosomen

7.4.2.1 Degranulation von Lysosomen in WT und Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten

Um die Sekretion der lytischen Granulen der CTLs nach Stimulation auf Einzelzellebene untersuchen zu können, musste dies mit einer anderen Methode als der ELISA Methode erfolgen. Für diese Zielsetzung bietet sich ein sogenannter Degranulationsassay basierend auf der Detektion der sezernierten Lysosomen an. Bei diesem Assay wird das Protein Lamp-1 (lysosome associated membrane protein 1) oder CD107a, das innerhalb der Lysosomen in der Vesikelmembran integriert ist, detektiert. So ist nach der Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran das Protein Lamp-1 auf der Oberfläche lokalisiert und kann mittels eines

fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpers gegen Lamp-1 sichtbar gemacht werden. Die Sekretion kann anhand der Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Zusätzlich kann auch die Korrelation wie viele Lysosomen sezerniert wurden durch die Intensität des Fluoreszenzsignals analysiert werden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Gesamtheit aller Lysosomen, die das Protein Lamp-1 besitzen und ihren Inhalt sezernieren, gemessen werden. Im Gegensatz zum ELISA, der die ausgeschütteten zytotoxischen Proteine, die in speziellen Lysosomen enthalten sind und somit eine Subpopulation der Lysosomen darstellt, detektiert.

Die CD8⁺ T-Lymphozyten von WT und Munc13-4-KO Mäusen wurden nach drei Tagen Stimulation für vier Stunden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper, die an der Oberfläche von Wells anhefteten, restimuliert. Zusätzlich wurde ein FITC-gekoppelter anti-CD107a Antikörper für die Dauer der Restimulation dazugegeben und anschließend wurden die Zellen mittels eines Durchflusszytometers analysiert.

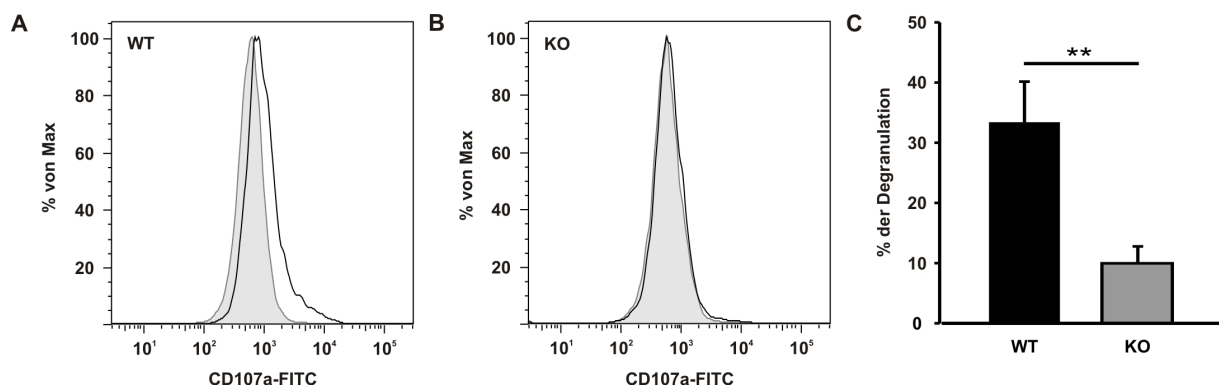


Abb. 26: Degranulation von Lysosomen der WT und Munc13-4-KO T-Zellen

A + B. Degranulation von Lysosomen, die Lamp-1 (CD107a) markiert sind, und somit mit einem anti-CD107a Antikörper an der Zelloberfläche detektiert werden. Die Fläche unterhalb der grauen Linie repräsentiert die Zellen, die nicht stimuliert werden (konstitutive Degranulation) und die Fläche unterhalb der schwarzen Linie repräsentiert die stimulierten Zellen mittels anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. C. Analyse der induzierten Degranulation (Subtraktion der konstitutiven Degranulation von der stimulierten Degranulation) (N = 4, n = 4; \pm SEM; Student's T-Test: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

In Abb. 26 wird deutlich, dass eine Stimulation eine Rechtsverschiebung des Peaks der WT CD8⁺ T-Lymphozyten zur Folge hatte. Im Gegensatz zu den WT CD8⁺ T-Lymphozyten haben die Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten nur eine kleine Anzahl von Zellen Lysosomen sezernierten. Deshalb ist die Verschiebung des Peaks sehr gering. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies, dass 33,38% (\pm 6,77% SEM) CD8⁺ T-

Lymphozyten Exozytose der Lamp-1 Lysosomen aufweisen und nur 9,96% (\pm 3,35% SEM) der Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten Lysosomen sezernierten. Da die Munc13-4-KO Zellen noch eine Restsekretion zeigen, kann dies entweder auf die Detektion der Gesamtpopulation der Lysosomen, d. h. dass andere Subpopulationen nicht mit Hilfe von Munc13-4 sezerniert werden oder noch eine konstitutive Sekretion vorhanden ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Sekretionsdefekt durch einen weiteren Primingfaktor in der Zelle wenigstens teilweise kompensiert wird.

7.4.2.2 Rescue der Degranulation von Lysosomen in Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten durch Überexpression von Munc13-4

Durch den Degranulationassay konnte gezeigt werden, dass Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten einen erheblichen Defekt bezüglich der Lysosomenfreisetzung haben. Ist dieser Defekt tatsächlich auf das Fehlen des Proteins Munc13-4 zurückzuführen, so kann die Funktion durch Expression des exogenen Proteins in den Zellen wiederhergestellt werden. Deshalb wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten mit einem Fusionskonstrukt Munc13-4-eGFP transfiziert und nach 4 h Inkubation konnte man eine grünfluoreszierende Färbung der CD8⁺ T-Lymphozyten mit Hilfe des Mikroskop erkennen. Dies bedeutet, dass das Protein exprimiert wurde. Der Degranulationsassay wurde aufgrund des eGFP-Konstrukt mit einem anti-Lamp-1 Antikörper, der mit dem Farbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt ist, durchgeführt. Die Exozytose von Lysosomen wurde mit der Durchflusszytometrie gemessen und analysiert.

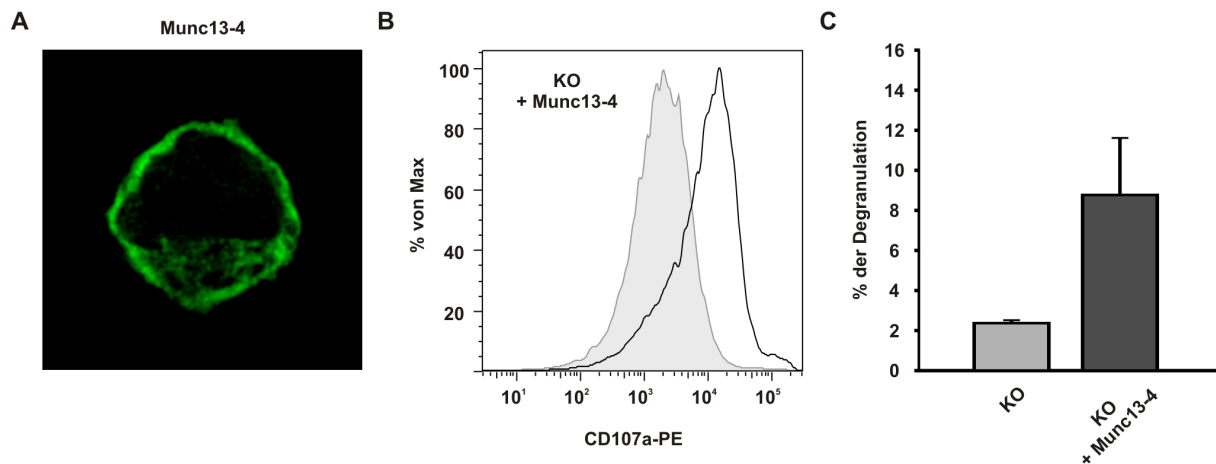


Abb. 27: Degranulation der Lysosomen aus Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten nach Transfektion mit mMunc13-4-eGFP

A + B. Die CD8⁺ T-Lymphozyten wurden mit dem Konstrukt mMunc13-4-eGFP transfiziert und nach 4 h Inkubation wurden die Zellen für den Degranulationsassay eingesetzt. A. mMunc13-4-eGFP Lokalisation nach dem die CD8⁺ T-Lymphozyten 4 h mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert wurden. B. Degranulation von Lysosomen, die Lamp-1 (CD107a) markiert waren, und somit mit einem anti-CD107a Antikörper an der Zelloberfläche detektiert wurden. Die Fläche unterhalb der grauen Linie repräsentiert die Zellen, die nicht stimuliert werden (konstitutive Degranulation) und die Fläche unterhalb der schwarzen Linie repräsentiert die stimulierten Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper. C. Analyse der induzierten Degranulation (Subtraktion der konstitutiven Degranulation von der stimulierten Degranulation) von nicht transfizierten CD8⁺ T-Lymphozyten und von Munc13-4-eGFP überexprimierten CD8⁺ T-Lymphozyten im Vergleich (N = 4, n = 4; ± SEM; Student's T-Test: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001).

Anhand der Abb. 27 kann man erkennen, dass nach der Stimulation das exprimierte Protein an der Plasmamembran lokalisiert war. Die Expression von Munc13-4 in den Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten führte dazu, dass mehr Zellen Lysosome exozytierten. So zeigten die transfizierten CD8⁺ T-Lymphozyten eine Degranulation von 8,75% (SEM ± 2,87%) und im Vergleich degranulieren nur 2,35% (SEM ± 0,17%) der KO CD8⁺ T-Lymphozyten. Dies bedeutet, dass 73,15% mehr Zellen durch die Translation von Munc13-4 Lamp-1 Lysosomen exozytierten.

7.4.2.3 Rescue der Degranulation von Lysosomen in Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten durch Überexpression von Munc13-1

Augustin et al. (1999) identifizierten Munc13-1, ein gehirnspezifischer Phorbol-esterrezeptor, als ein notwendiges Protein für synaptische Vesikelreifung. Sie zeigten, dass Munc13-1 essentiell für die Fusionskompetenz von glutamaterge synaptische Vesikel ist. Mäuse, die kein Munc13-1 synthetisieren, formen normale ultrastrukturelle Synapsen, aber die Transmitterfreisetzung kann nicht durch einen Stimulus, wie Aktionspotential, Kalziumionophore oder hypertone Sucroslösung, ausgelöst werden.

Ashery et al. (2000) konnten zeigen, dass Munc13-1 bei Überexpression einen erheblichen Einfluss auf die Exozytose von Noradrenalin und Adrenalin in Chromaffinzellen hat. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eine vierfache Menge an gepimten Vesikel sezerniert werden können. Deshalb ist es interessant zu wissen, ob auch eine andere Munc13 Isoform, die sogar in CD8+ T-Lymphozyten transkribiert wird, die Funktion von Munc13-4 zumindest teilweise übernehmen kann. Deshalb wurden die Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten mit dem Munc13-1-eGFP-Konstrukt transfiziert. Auch bei diesem Experiment wurde der Assay 4 h nach Transfektion begonnen. Obwohl Munc13-1 um 1887 bp länger ist, war schon nach 4 h das Protein translatiert, was an der grünen Fluoreszenz zu erkennen war.

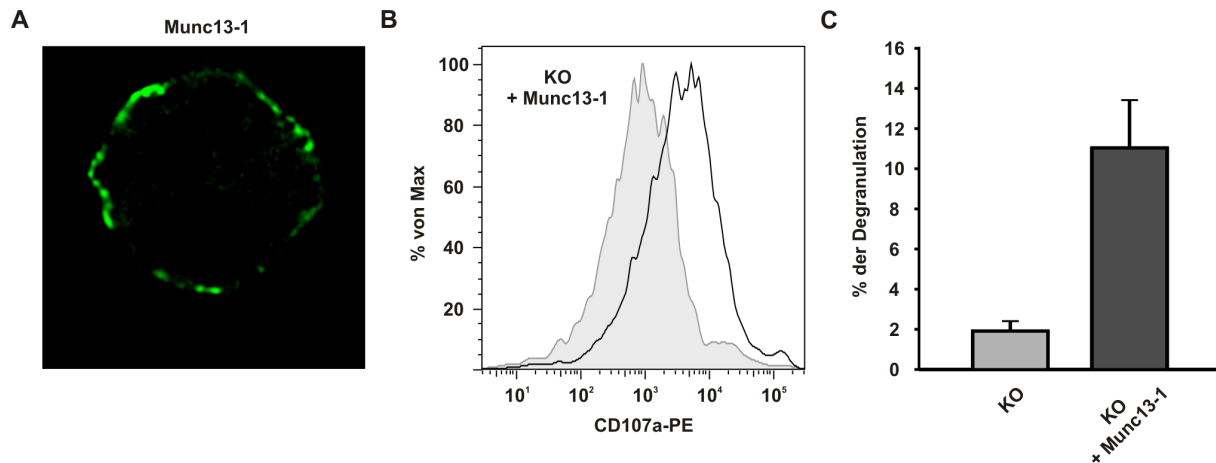


Abb. 28: Degranulation von Lysosomen Munc13-4 KO CD8+ T-Lymphozyten nach Transfektion mit mMunc13-1-eGFP

A + B. Die CD8+ T-Lymphozyten wurden mit dem Konstrukt mMunc13-4-eGFP transfiziert und nach 4 h Inkubation wurden die Zellen für den Degranulationsassay eingesetzt. A. mMunc13-4-eGFP Lokalisation nach dem die CD8+ T-Lymphozyten 4 h mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimulierten wurden. B. Degranulation von Lysosomen, die Lamp-1 (CD107a) markiert waren, und somit mit einem anti-CD107a Antikörper an der Zelloberfläche detektiert wurden. Die Fläche unterhalb der grauen Linie repräsentiert die Zellen, die nicht stimuliert werden (konstitutive Degranulation) und die Fläche unterhalb der schwarzen Linie repräsentiert die stimulierten Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper. C. Analyse der induzierten Degranulation der Lysosomen von Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten und Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten, die Munc13-1 exprimieren im Vergleich (N = 4, n = 4; \pm in SEM; Student's T-Test: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Aus Abb. 28 kann man entnehmen, dass das Munc13-1 Protein nach 4 h Stimulation an der Membran lokalisiert war und funktionell einen sehr positiven Einfluss auf die Sekretion von Lysosomen besaß. 11,08% (SEM \pm 2,34%) der Munc13-1 transfizierten Zellen zeigten Sekretion im Vergleich dazu sezernierten nur 1,95% (SEM \pm 0,46%) der Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten. Somit sezernierten, aufgrund der Expression von Munc13-1, 82,4% mehr CD8+ T-Lymphozyten als nicht-transfizierte Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten.

PMA ist ein Phorbolster, der auch als ein DAG-Analogon eine Rolle in der Verteilung von Munc13-1 intrazellulär spielt. Da PMA an der C1-Domäne bindet, wird das Protein an die Zellemembran transloziert und eine höhere Sekretion von dense core Vesikel in Chromaffinzellen zur Folge hat, da vermehrt Primingfaktor an der Plasmamembran vorhanden ist und mehr gedockte Vesikel geprimt werden können, Dadurch steigt die Anzahl der sezernierten Vesikel stark an (Ashery et al., 2000).

Um die Auswirkung von PMA auf Munc13-1 in CD8⁺ T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden Munc13-1 transfizierte Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten mit 100 nM PMA für die Länge des Degranulationsassays behandelt, um eine Dissoziation von PMA während des Versuches zu vermeiden.

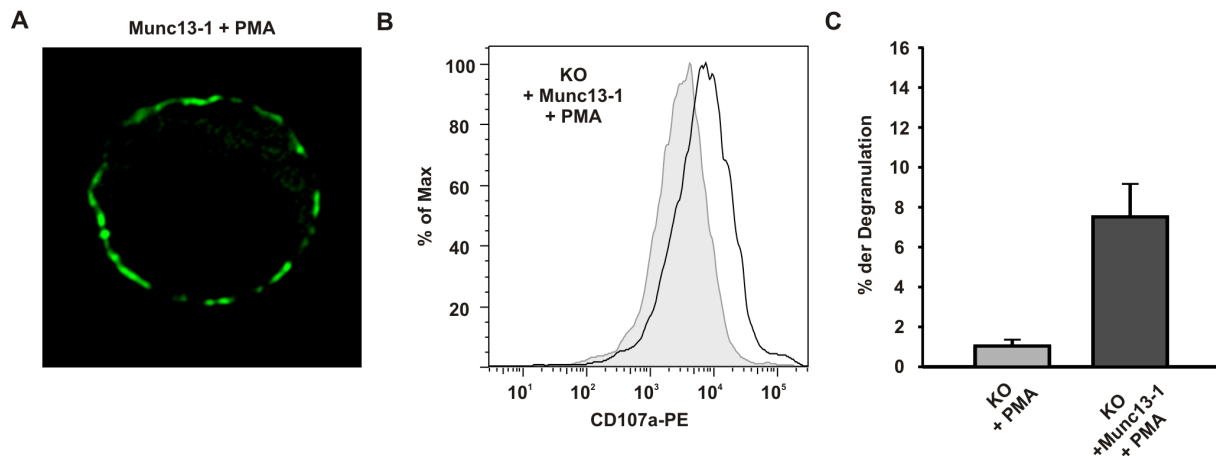


Abb. 29: Degranulation von Lysosomen Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten nach Transfektion mit mMunc13-1-eGFP und PMA-Behandlung

A + B. Nach 4 h nachdem die Zellen mit mMunc13-1-eGFP wurden die Zellen für den Degranulationsassay eingesetzt und mit 100 nM PMA versetzt. A. mMunc13-1-eGFP Lokalisation nach dem die CD8⁺ T-Lymphozyten 4 h mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimuliert wurden. B + C. Degranulation von Lysosomen, die Lamp-1 (CD107a) markiert waren, und somit mit einem anti-CD107a Antikörper an der Zelloberfläche detektiert wurden. Die Fläche unterhalb der grauen Linie repräsentiert die Zellen, die nicht stimuliert werden (konstitutive Degranulation) und die Fläche unterhalb der schwarzen Linie repräsentiert die stimulierten Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper. C. Analyse der induzierten Degranulation der Lysosomen von Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten und Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten, die Munc13-1 exprimieren und mit PMA behandelt worden sind im Vergleich (N = 4, n = 4; ± SEM; Student's T-Test: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001).

PMA bindet an die C1-Domäne von Munc13-1, dadurch wurde das Protein an die Plasmamembran transloziert. Munc13-1 ist nach 4 h Stimulation mit den Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 an der Membran lokalisiert, allerdings ist dies auch ohne Mithilfe von PMA zustande gekommen (Abb. 29).

Aus Abb. 4.19 ist zu erkennen, dass PMA einen negativen Einfluss auf die Sekretion der Lysosomen ausübte. Dadurch wurden weniger Lysosomen sezerniert. So exozytierten nur 1,08% (SEM ± 0,28%) der Munc13-4 KO CD8⁺ T-Lymphozyten, die mit PMA behandelt wurden. Durch die Expression von Munc13-1 wurde die Degranulation der KO CD8⁺ T-Lymphozyten erhöht, 7,55% (SEM ± 1,62%) der

Zellen sezernierten Lysosome. Dadurch sezernierten 85,7% mehr Zellen durch die Funktion von Munc13-1, trotz der PMA Behandlung.

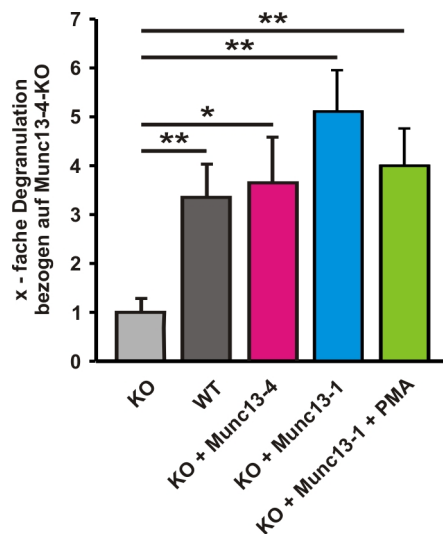


Abb. 30: Analyse des Resue-Degranulationsassays bezogen auf die Degranulation der Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten

Normalisierung der induzierten Sekretion von Lysosomen von WT CD8+ T-Lymphozyten, mit Munc13-4 transfizierten Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten, mit Munc13-1 transfizierten Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten und mit Munc13-1 transfizierten Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten, die mit 100 nM PMA behandelt worden sind. (N = 4, n = 4; \pm SEM; Student's T-Test: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

Um die Degranulation der verschiedenen Bedingungen vergleichen zu können, wurde die Degranulation von Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten auf 1 gesetzt und die Degranulation der WT CD8+ T-Lymphozyten und der transfizierten Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten wurden dementsprechend auf die Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozytendegranulation normalisiert (Abb. 30). Allerdings wurden die transfizierten Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten Ergebnisse auf die jeweiligen Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten, als interne Kontrolle, bezogen. Dies wurde aus zwei Gründen getan. Zum einen resultiert die interne Kontrolle aus demselben Experiment, das bedeutet die Kontrollzellen sind ebenfalls elektroporiert worden und somit kann ein Einfluss der Elektroporation auf die Degranulation der transfizierten CD8+ T-Lymphozyten relativiert werden. Und zum anderen wurde die Sekretion der transfizierten Zellen auf die Sekretion der nicht-transfizierten Zellen, die aus der gleichen Isolation stammen und zusammen stimuliert wurden, bezogen und somit

können Differenzen, die sich durch verschiedene Isolations- oder Stimulationsbedingungen ausgeschlossen werden.

Wie aus der Abb. 30 zu erkennen ist, haben die WT CD8⁺ T-Lymphozyten eine 3,35-fache (SEM \pm 0,68%) erhöhte Degranulation im Gegensatz zu Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten. Dies bedeutet, dass 3,35 mal mehr Zellen Lysosomen sezernierten. Die exogene Expression von Munc13-4 in Munc13-4-KO Zellen führte sogar zu einer noch höheren Degranulation im Vergleich zu WT Zellen. Die Munc13-4 transfizierten Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten zeigten eine 4,07-fache (SEM \pm 1,33) Degranulation, somit kann gezeigt werden, dass die Funktion der Degranulation durch die Transfektion von Munc13-4 wieder hergestellt wurde. Es kann aber auch gezeigt werden, dass Munc13-1 nachdem es in den Munc13-4 KO CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert wurde, den Degranulationsdefekt ausgleichen kann. Durch die exogene Expression konnten 5,15 mal (SEM \pm 1,09) mehr CD8⁺ T-Lymphozyten Lysosome sezernieren. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl die Kontroll-CD8⁺ T-Lymphozyten als auch die transfizierten CD8⁺ T-Lymphozyten mit Munc13-1, die mit PMA behandelt worden sind eine geringere Degranulation. Dies bedeutet, dass PMA einen negativen Einfluss auf die Sekretion von Lysosomen ausübte. Die Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten mit PMA haben eine um 0,5-fache (SEM \pm 0,13) geringere Degranulation, also nur die Hälfte der CD8⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zu den nicht-behandelten Zellen sezernierten. Somit hatte PMA einen kontraindizierten Einfluss auf die Sekretion der mit Munc13-1 transfizierten Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten. Dadurch zeigen diese Zellen im Vergleich zu den Munc13-1 transfizierten CD8⁺ T-Lymphozyten ohne PMA Behandlung einen geringeren Effekt auf die Degranulation, aber immerhin ist der positive Einfluss von Munc13-1 so hoch, dass 3,51 (SEM \pm 0,753) mehr CD8⁺ T-Lymphozyten sezernierten im Vergleich zu Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten.

Dieses Ergebnis beweist, dass sowohl exogene Expression von Munc13-4 wie auch die exogene Expression von Munc13-1 den Defekt von Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten in einem noch höheren Ausmaß als die endogene Expression von Munc13-4 ausgleichen kann.

7.5 Morphologische Untersuchungen der CD8⁺ T-Lymphozyten nach Bildung einer IS mittels anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen

Wie schon oben erwähnt, kommt es zu einer Umstrukturierung des Mikrotubuliorganisationszentrum und damit auch zur Neuordnung des Mikrotubulinetzwerkes während der IS-Bildung. Dies ermöglicht es Vesikel, insbesondere lytische Granulen, zur IS zu transportieren und zu sezernieren.

Nachdem durch den Granzym B ELISA gezeigt werden konnte, dass Munc13-4-KO CTLs wesentlich weniger Granzym B sezernieren bei gleicher synthetisierter Granzym B Menge, lag es nahe die lytischen Granulen in CTLs nach Stimulation bezüglich ihrer Lokalisation zu untersuchen. Dazu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von WT und Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten nach einer 1 h und 4 h Stimulation analysiert. Zur Kontrolle, dass die Synapse nach 1 h und nach 4 h noch besteht, wurden CD8⁺ T-Lymphozyten auf anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläser ausplattiert und nach einer 1 stündigen bzw. 4 stündigen Inkubationszeit mit anti- α -Tubulin Antikörpern angefärbt.

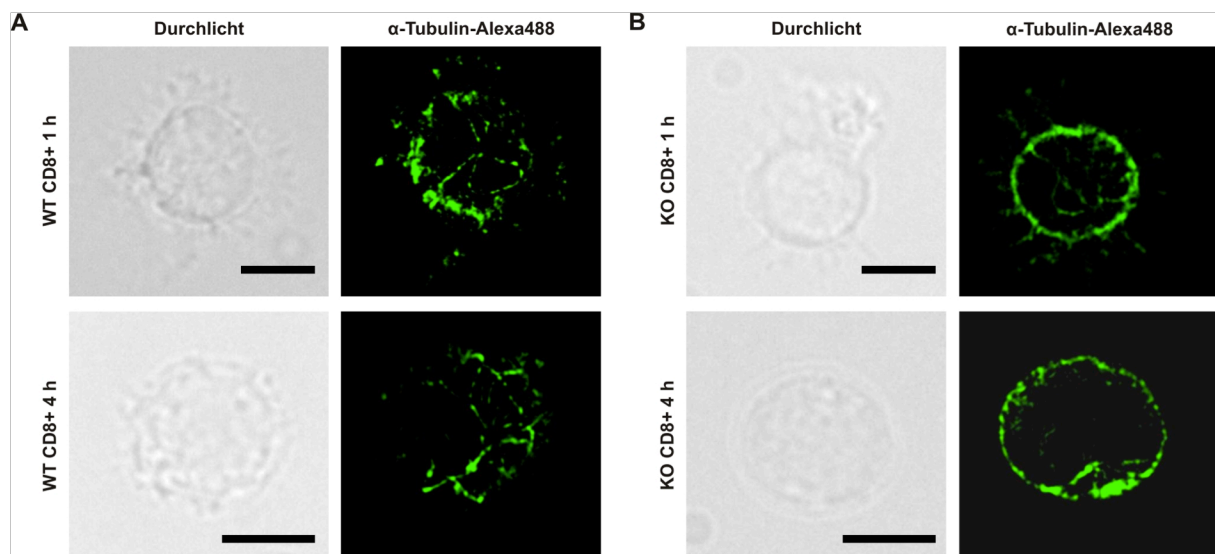


Abb. 31: Mikrotubulianordnung nach 1 h und nach 4 h Inkubation

A + B. WT und Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten wurden für 1 h bzw. 4 h auf anti-CD3/CD28 Antikörper beschichtete Deckgläser ausplattiert und mit anti- α -Tubulin angefärbt. Die Präparate wurden mit dem SIM ausgewertet (Maßstab 5 μ m).

Anhand der Abbildungen kann man sehen, dass sowohl die WT als auch die Munc13-4-KO CTL noch die typischen Mikrotubulistrukturen einer IS nach 1 h und

nach 4 h Stimulation zeigen. Allerdings sind die Strukturen nicht mehr so klar als die Mikrotubulistrukturen nach 20 min Inkubation (Abb. 31). Dies könnte evtl. auf eine teilweise Reorganisation der Mikrotubuli hinweisen.

Die EM-Aufnahmen sind unter den gleichen Bedingungen der CD8⁺ T-Lymphozyten wie auch für die Immunfärbungen durchgeführt worden.

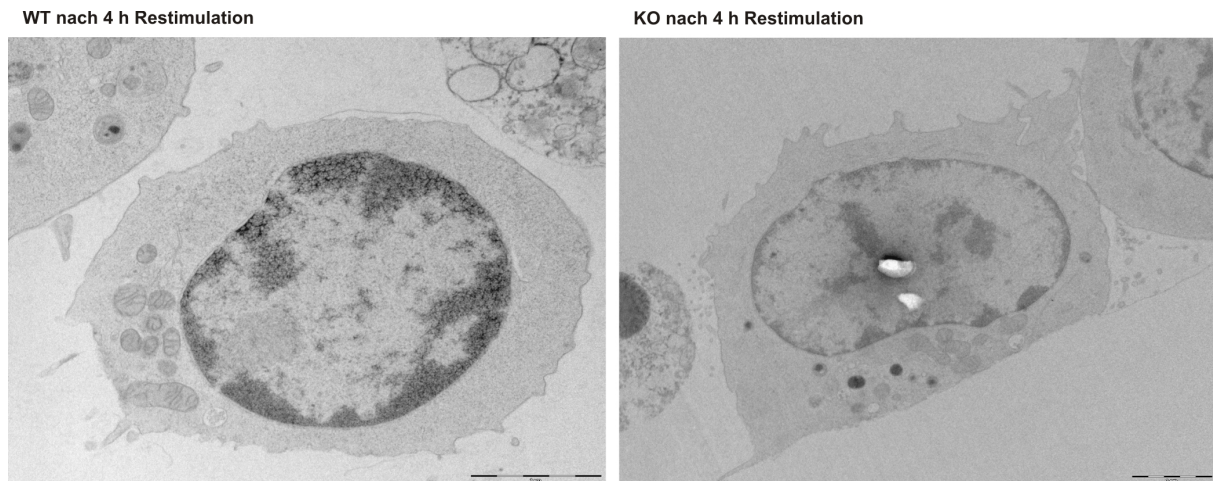


Abb. 32: Ultrastruktur von einem WT CD8⁺ T-Lymphozyt und einem Munc13-4 KO CD8⁺ T-Lymphozyt nach 4 h Restimulation

WT und Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten wurden für 1 h bzw. 4 h auf anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläser ausplattiert und mit der „high-pressure freezing“ Methode fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Präparate mit Osmium. Die Präparate wurden mit dem EM ausgewertet. Lytische Granula sind als schwarze Granulen erkennbar.

Anhand der EM-Bilder wurden die lytischen Granula nach 4 h Restimulation in WT und Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten analysiert. Die lytischen Granula konnten als schwarze Vesikel in den Zellen identifiziert werden. Dazu wurden 21 WT CD8⁺ T-Lymphozyten und 23 Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten ausgewertet. Von den WT CD8⁺ T-Lymphozyten besitzen noch 9 WT CTLs lytische Granula im Gegensatz zu den Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten, wobei noch bei 7 CD8⁺ T-Lymphozyten lytische Granulen nachweisbar waren. Allerdings war die Anzahl der lytischen Granulen in den Munc13-4-KO CTLs im Vergleich zu den WT CTLs verändert. D. h. es konnten insgesamt 15 lytische Granulen in den 7 Munc13-4 KO CTLs und 11 lytische Granulen in den 9 WT CTLs identifiziert werden.

7.6 Zytotoxizität der WT und Munc13-4-KO CTLs

4.6.1 ⁵¹Cr-Freisetzungssassay

Munc13-4-KO CTL haben eine erheblich verringerte Exozytosefunktion der lytischen Granulen aufgrund des Verlustes von Munc13-4. Dadurch stellte sich die Frage, ob und in welchem Maß die Zytotoxizität bzw die Exozytose der CTLs herabgesetzt ist oder ob es möglich ist, dass der Degranulationsdefekt durch andere Mechanismen ausgeglichen werden kann. Um dies zu untersuchen wurde ein sogenannter Killing-assay durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der Detektion abgestorbener APCs, die auch als Zielzellen bezeichnet werden. Dazu wurden die Zielzellen mit einer radioaktiven Substanz beladen. Sterben die Zellen ab, wird die Integrität der Plasmamembran zerstört und die radioaktive Substanz kann aus den Zellen in die extrazelluläre Flüssigkeit entweichen. Die Radioaktivität wurde anschließend im Überstand gemessen. Um eine Aussage über die gezielte Abtötung der APCs treffen zu können, wurde die maximale Radioaktivität gemessen und die Werte wurden auf die maximale Radioaktivität ins Verhältnis gesetzt.

Um den physiologischen Charakter der Immunantwort der CTLs zu erhalten, wurde den Mäusen ein LCMV intravenös injiziert. Nach 8 Tagen war die Immunantwort in den WT CTL abgeschlossen, aber dennoch war die Population der CTLs nicht wieder auf das normale Level dezimiert worden. Somit waren in der Milz fast ausschließlich CTLs zu finden. Deshalb konnten die Lymphozyten, die hauptsächlich (ca. 90%) aus CD8⁺ T-Lymphozyten bestehen, aus der Milz isoliert werden und in den Killingassay als Effektorzellen eingesetzt werden. Der Assay ist demnach eine reine CD8⁺ T-Lymphozytenantwort auf die Virusinfektion. Die CTLs erkennen das Virus spezifisch und erkennen somit auf die Zielzellen spezifisch, da diese zuvor mit einem Viruspeptid, das von dem Virus stammt, „gelpulst“ worden sind.

Das Experiment wurde mit verschiedenen E:T-Ratios (Effektorzellen : Targetzellen oder Zielzellen) durchgeführt. Aus Abb. 33 kann man entnehmen, dass bei einer Ratio von 30:1 94,13% (SEM ± 0,64%) der Zielzellen abgetötet worden sind. Bei einer Ratio von 10:1 wurden 84,54% (SEM ± 1,12) der APCs getötet, bei 3:1 noch 78,65% (SEM ± 0,73%). Im Gegensatz dazu wurden nur 19,32% (SEM ± 1,54%) bei einer Ratio von 30:1, 16,66% (SEM ± 1,3%) bei 10:1 und 13,27% (SEM ± 0,97%) bei 3:1 der Zielzellen in den Munc13-4-KO Experimenten abgetötet.

Dies entspricht einer Differenz von 59,33% (30:1), was bedeutet, dass die Munc13-4-KO auf jeden Fall einen Defekt im Abtötungsmechanismus aufwies (Abb. 33).

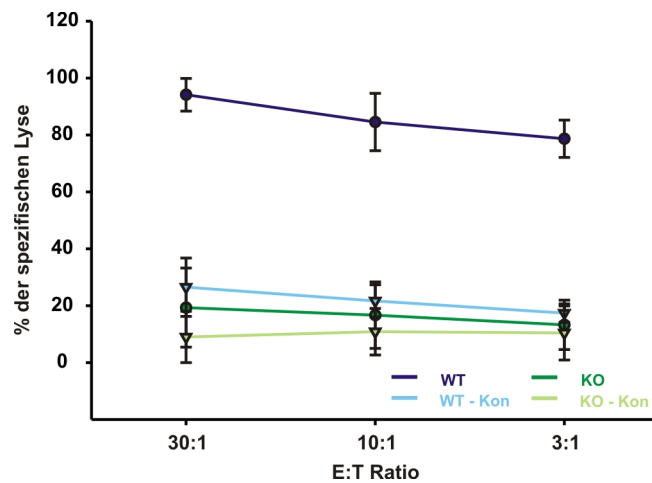


Abb. 33: ^{51}Cr -Freisetzungssassay nach Bildung von CTL/APC-Konjugate

WT wie auch Munc13-4 KO Mäuse wurden mit LCMV infiziert und nach 8 d wurden die T-Lymphozyten isoliert. Als APC wurden MC57 benutzt, die mit einem LCMV-Peptid gepulst und mit ^{51}Cr beladen wurden. Die Zellen wurden zusammen für 6 h inkubiert und anschließend erfolgt die Analyse von ^{51}Cr im Überstand mit einem β -Counter (N = 3, n = 3; \pm SEM) \pm .

Um auszuschließen, dass die Zielzellen aufgrund anderer Mechanismen abgestorben sind, wurden Kontrollversuche mit Zielzellen, die nicht mit einem Viruspeptid gepulst worden sind, durchgeführt. Dadurch präsentierten die APCs keine Antigene auf ihrer Oberfläche und dadurch konnten die CTLs nicht spezifisch über den Peptid-MHC-Komplex die Zielzelle erkennen. Kam es dennoch zum Absterben der Zellen, konnte dies nicht auf ein spezifisches Abtöten über den lytischen Granulen-vermittelten Signalweg durch die Effektorzelle erfolgt sein. Aus Abb. 33 ist zu entnehmen, dass alle Kontrollversuche einen Killingeffekt aufweisen, der allerdings nur geringfügig ist. So zeigen die WT CTLs mit einer Ratio 30:1 ein Killingeffekt von 26,5% (SEM \pm 10,26%) im Vergleich dazu zeigen die KO CTLs einen Effekt von 9% (SEM \pm 9,03%) und noch geringeren Effekt bei den Ratios 10:1 (WT 21,67%, SEM \pm 5,69%; KO 10,85%, SEM \pm 8,17%) und 3:1 (WT 17,39%, SEM \pm 3,25%; KO 10,41%, SEM \pm 9,49%).

7.6.2 Apoptoseuntersuchung anhand von Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in den APCs

7.6.2.1 Intrazelluläre Kalziumkonzentrationmessung $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der CTLs und APCs während der IS-Bildung und des Abtötens

Der Killingassay zeigte, dass obwohl die Munc13-4-KO CTLs eine erhebliche Reduktion der Freisetzung von lytischen Granulen aufwiesen, eine Restkillingfunktion vorhanden war. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde der Killingsprozess auf Einzelzellebene untersucht. Dazu wurde die IS nachgeahmt, indem kultivierte Zellen, d. h. 3 Tage stimulierte CD8+ T-Lymphozyten mit P815 Zellen, die als APC dienten, mittels eines anti-CD3 Antikörpers konjugiert wurden. P815 Zellen eigneten sich als APCs, da sie ein Fc-Rezeptor besitzen und den konstanten Teil von einem anti-CD3 Antikörper binden können. Der variable Teil des Antikörpers bindet an die CD3-Moleküle der CTLs, die dadurch aktiviert werden und den Killingsprozess in Gang setzen. Dieser Mechanismus wird als indirekte Lyse bezeichnet. Es wurde sowohl die Kalziumkonzentration in den APCs als auch in den CTLs gemessen, um zum einen das Abtöten der APCs durch den Kalziumkonzentrationsanstieg zu detektieren, als auch die Signaltransduktion in den CTLs messen zu können. Dazu wurden beide Zellarten mit Fluo-4 beladen, um die Kalziumintensitäten bestimmen zu können. Nachdem die CTLs die APCs erkennen und eine IS ausbilden, kommt es zu einem schnellen Kalziumanstieg. Dies ist zudem ein Zeichen, dass die Signaltransduktion induziert worden ist und die lytischen Granulen zur Synapse translozieren und schließlich sezerniert werden. In den APCs ist eine Erhöhung der Kalziumkonzentration ein frühes Zeichen der Apoptose. Um die CTLs von den APCs unterscheiden zu können, wurden die CTLs mit anti-CD3 Antikörpern, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa647 gekoppelt ist, beladen. Dadurch werden CD3-Moleküle, die während der Färbung sich auf der Zelloberfläche befinden, angefärbt und anschließend mit den Antikörpern endozytiert. Die Analyse erfolgte über die Messung der Fluoreszenzintensität des Kalziumsignals sowohl in den CTLs als auch in den APCs.

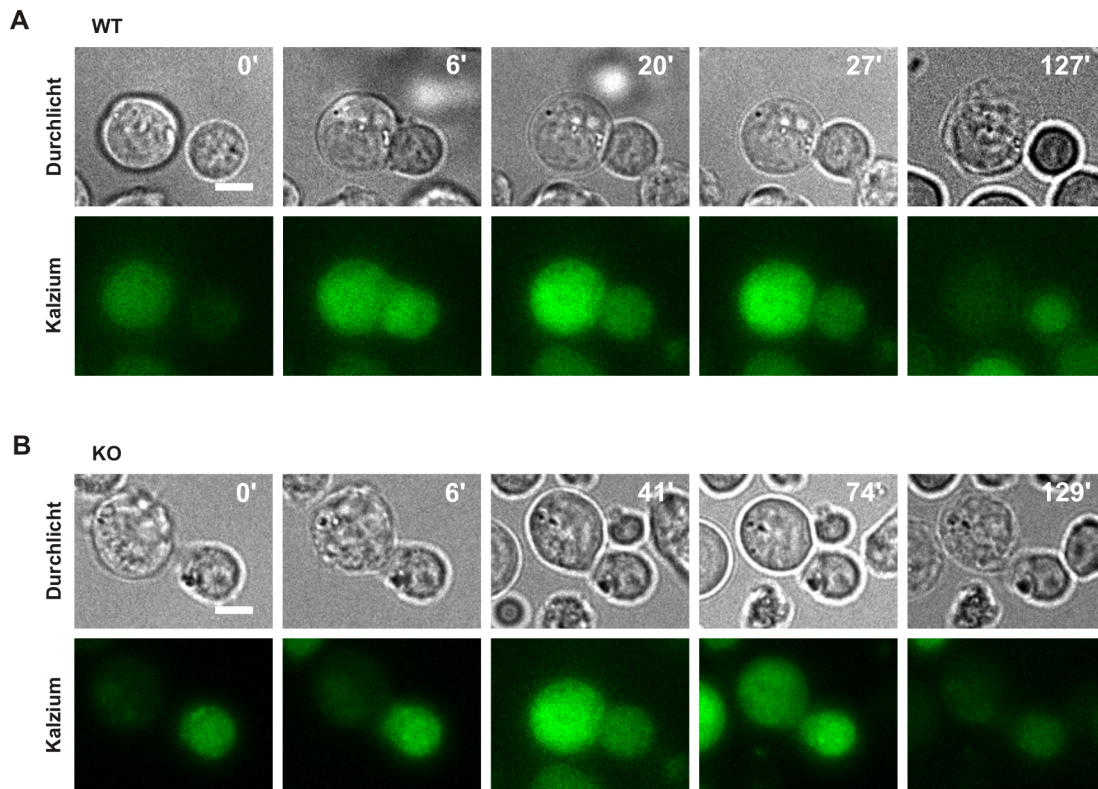


Abb. 34: Kalziumkonzentrationsmessung der CTLs aus WT und Munc13-4-KO Mäuse und APCs

A + B. Sowohl CTLs aus WT und Munc13-4-KO Mäusen als auch P815 Zellen (APCs) wurden mit Fluo-4 beladen und zusätzlich wurden die CTLs mit Alexa647-anti-CD3 Antikörpern angefärbt. Nach 20 min wurden die Zellen gewaschen und die P815 Zellen wurden mit anti-CD3 Antikörpern versetzt. Anschließend wurden die Zellen auf ein Deckglas überführt und alle 10 s wurde ein Durchlichtbild, Fluoreszenzbild der Wellenlänge 647 nm und 488 nm mit Hilfe des SIM aufgenommen (Maßstab 5 μ m).

Die Kalziumkonzentration der CTLs, sowohl der WT CTLs als auch der Munc13-4-KO CTLs, nimmt nach Kontakt mit den APCs sehr schnell zu und bleibt über mehrere Minuten auf einem erhöhten Kalziumlevel. Nach circa zwei Stunden nimmt die Kalziumkonzentration wieder ab. Die Fluoreszenzintensität des Fluo-4 Farbstoffs in den APCs nahm nach Kontakt mit den CTLs langsam aber stetig zu bis die Zellen nach circa 2 Stunden abstarben und der Farbstoff aus den Zellen diffundierte. Dabei nahm die Kalziumkonzentration der APCs aus den WT Experimenten viel stärker zu als im Vergleich zu den Munc13-4-KO Experimenten.

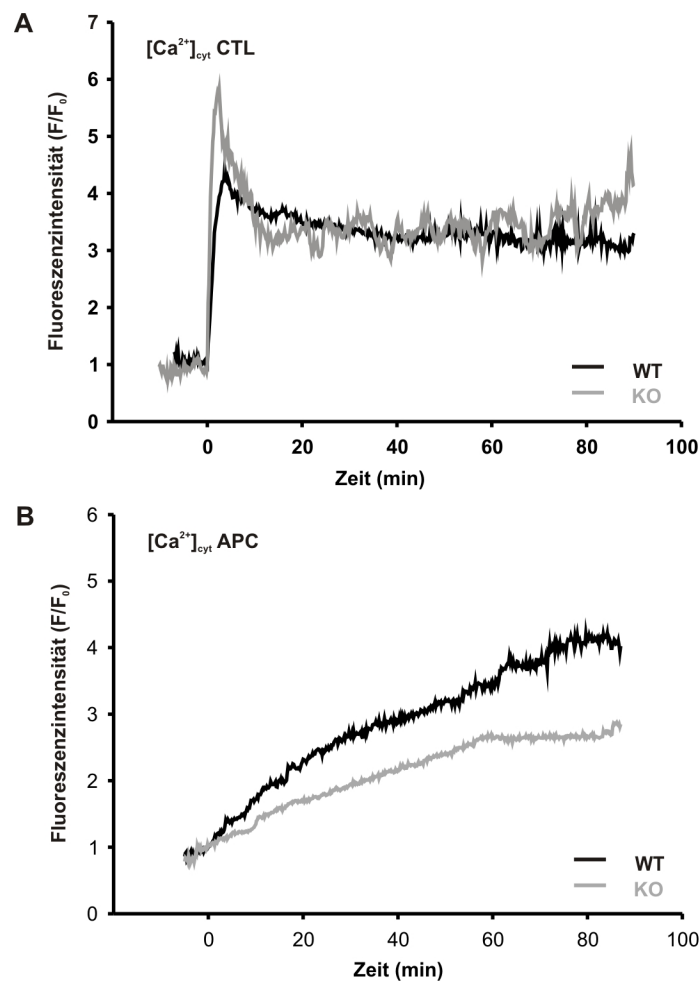


Abb. 35: Kalziumkonzentrationsverlauf nach Bildung einer IS mit WT und Munc13-4-KO CTLs und APCs

Intensität der Fluoreszenzmessung wurde mit Hilfe des EasyTrack Programm sowohl für die CTLs als auch für die APCs gemessen und die Mittelwerte wurden in den Diagrammen auf die Zeit bezogen aufgetragen (WT: N = 7; n = 12 ; Munc13-4: N = 7; n = 16).

In Abb. 35 kann man erkennen, dass nach Ausbildung der IS (Zeitpunkt 0) die Fluoreszenzintensität der WT CTLs also auch der Munc13-4-KO CTLs zunächst stark zunahm und danach auf ein sogenanntes Plateau abfiel. Die Plateaukalziumkonzentration blieb über die Dauer des Versuches erhalten. Die Kalziumkonzentration der APC (die mit der WT CTL eine Synapse bildet), stieg, wie zu erwarten ist, nur langsam aber stetig an. Die APC, die mit den Munc13-4 KO CTL eine Synapse bilden, zeigen ebenfalls einen langsamen Kalziumanstieg allerdings ist die Intensität erheblich geringer als bei der WT Synapse. Dies spricht dafür, dass die KO CTL eine stark verminderte Exozytose der lytischen Granulen aufwies. Aber dennoch war deutlich eine erhöhte Kalziumkonzentration in den APC zu beobachten.

Somit wurden die APC zwar in den KO Experimenten abgetötet, aber nicht so effektiv.

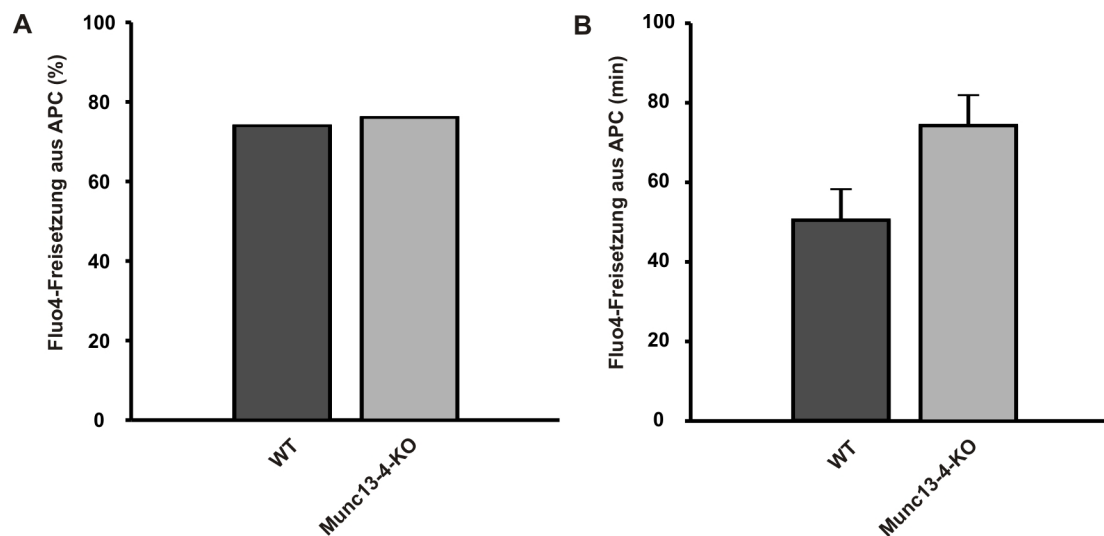


Abb. 36: Fluo-4 Diffusion aus den abgestorbenen APCs

A. Anzahl der APCs aus den WT CTLs bzw. aus den Munc13-4-KO CTL Experimenten, die den Farbstoff Fluo-4 Verlust aus der Zelle aufgrund der Zerstörung der Plasmaintegrität aufwiesen. B. Zeitliches Auftreten der Zerstörung der Plasmamembran durch die Fluo-4 Freisetzung (WT: N = 7; n = 23; KO: N = 9; n = 25; \pm SEM).

Ein frühes Anzeichen für die Apoptose ist die Kalziumkonzentrationserhöhung, deshalb wurde für dieses Experimente die Kalziumkonzentrationserhöhung der APC als Maß für das Abtöten der APC durch die CTL herangezogen. Sowohl die APC der WT Experimente als auch der Munc13-4-KO Experimente zeigten einen Intensitätszunahme des Fluoreszenzfarbstoff, aber um Differenzen der Tötungsmechanismen zu untersuchen, wurden die Experimente auf weitere Anzeichen der Apoptose hin untersucht. Dazu zählen der Verlust des Farbstoffes durch die Zerstörung der Plasmamembranintegrität der APCs und die schon abgestorbenen Zellen.

Es ist zwar eine erhöhte Kalziumkonzentration in den APCs zu beobachten, aber bei nicht allen Zellen ist die Zerstörung der Integrität der Plasmamembran und die typische „Blebb“-Bildung der Apoptose zu erkennen. 73,9% APCs der WT und 76% der APCs der Munc13-4-KO Experimente verzeichneten einen Farbstoffverlust. Damit kann gezeigt werden, dass sowohl die WT als die Munc13-4 KO CTLs die gleiche Anzahl der APC töten. Allerdings trat der Farbstoffverlust bei den WT Experimenten schneller mit 50,46 min (SEM \pm 7,59 min) ein. Im Vergleich dazu trat

der Farbstoffverlust in den Munc13-4-KO Experimenten erst nach 74,43 min (SEM \pm 7,48 min) ein (Abb. 36).

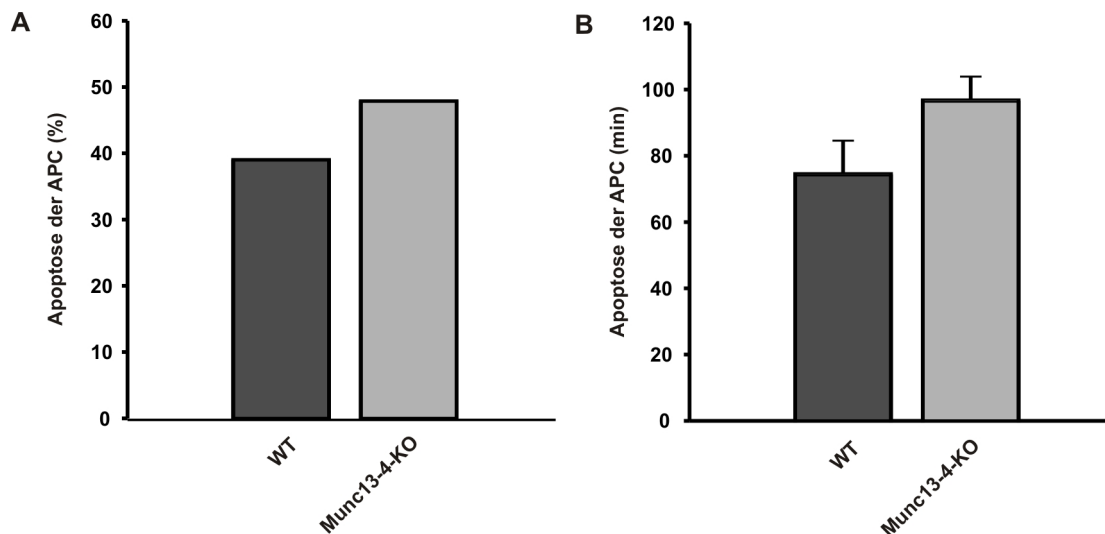


Abb. 37: Analyse der abgestorbenen Zellen als Endpunkt der Apoptose

A. Anzahl der APCs aus den WT bzw. aus den Munc13-4-KO Experimenten, die abgestorben sind, d. h. die den totalen Verlust Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 aufwiesen. B. Zeitliches Auftreten der Zerstörung der Plasmamembran, durch die Fluo-4 Freisetzung (WT: N = 7; n = 9 von 17 Experimenten, die einen Farbstoffverlust aufwiesen; KO: N = 9; n = 12 von 25 Experimenten, die einen Farbstoffverlust aufwiesen; \pm SEM).

Von 17 APCs der WT Experimenten, die einen Farbstoffverlust aufwiesen, zeigten nur 9 davon einen totalen Verlust des Farbstoffes. Im Vergleich dazu haben 12 APCs von 19 APCs, die einen Verlust aufwiesen, keine komplett erhaltene Plasmamembran, die den Farbstoff im Zellinnern in den Munc13-4-KO Experimenten halten konnte. Somit sind insgesamt 39,13% der APCs in den WT Experimenten und 48% der APCs in den KO Experimenten abgestorben. Daraus kann gefolgert werden, dass die Munc13-4-KO CTLs tendenziell mehr APCs abtöten konnten. Allerdings brauchten die APCs der Munc13-4-KO Experimenten tendenziell länger bis sie den Farbstoff völlig verloren haben und somit abgestorben waren. So zeigten die APCs in den WT Experimenten nach 74,76 min (SEM \pm 29,43 min) keinen Farbstoff in den Zellen und die APCs der KO Experimente zeigten einen totalen Verlust des Farbstoffes nach 97 min (SEM \pm 23,91 min).

Nachdem die CTLs aus der Munc13-4-KO Maus die APCs abtöten können, obwohl eine starke Reduktion der lytischen Granulenfreisetzung und somit diese nicht über oder nur geringfügig über den lytischen Granulen-vermittelte Signalweg abgetötet

werden können, kommt ein anderer Mechanismus in Frage. In der Literatur wird der Fas/FasL-Signalweg als zweiter Signalweg erwähnt, allerdings wird dieser Signalweg im Allgemeinen als zweitrangig angesehen.

7.6.2.2 Expression von FasL in CD8+ T-Lymphozyten

Der Fas/FasL-Signalweg wurde als Regulationsmechanismus der Homöostase der CTLs entdeckt. Die CTLs proliferieren nach Stimulation massiv um die Pathogene, die sich im Körper befinden abzutöten. Nachdem die Pathogene abgetötet worden sind, muss die CTL Population wieder auf ein normales Level dezimiert werden und nur eine geringe Anzahl an CTLs überleben als CD8+ Gedächtniszellen. Die Dezimierung erfolgt über den Fas/FasL-Signalweg.

Zunächst wurde das Expressionsmuster des FasL in den CD8+ T-Lymphozyten untersucht. Dafür wurden CD8+ T-Lymphozyten direkt nach der Isolation (unstimulierte CD8+ T-Lymphozyten), 1 d, 2 d und 3 d stimulierte Zellen lysiert und die Proteinlysate wurden in der Western Blot Methode eingesetzt.

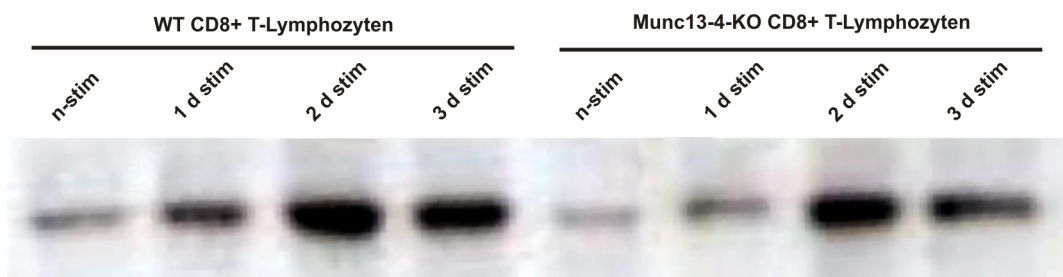


Abb. 38: Expression von FasL in CD8+ T-Lymphozyten nach verschiedenen Stimulationszeitpunkten

Detektion der FasL Expression von nicht-stimulierten CD8+ T-Lymphozyten, 1 d, 2 d und 3d stimulierten CD8+ T-Lymphozyten der WT und Munc13-4-KO Mäusen. Dafür wurden jeweils 75 µg Proteinlysate auf ein 10% SDS-Acrylamidgel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Aus der Abb. 38 ist zu entnehmen, dass bereits die unstimulierten Zellen FasL exprimierten und durch die Stimulation wurde die Expression bis zu Tag 2 hochreguliert. Am dritten Tag war eine geringere Expression von FasL zu verzeichnen. Dies könnte durch das Splitten der Zellen an Tag 2 hervorgerufen

worden sein, da die Zelldichte in der Kulturschale abnimmt und somit könnte dies einen Einfluss auf die Expression genommen haben. Die FasL Expression war sowohl in den WT CTLs als auch in den Munc13-4-KO CTLs ähnlich. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine Kompensation durch eine erhöhte FasL Expression in den Munc13-4-KO CTLs in Frage kommen kann.

4.6.2.2.1 Immunfärbung von FasL in CD8+ T-Lymphozyten

Es ist bekannt, dass naive CTLs keine FasL exprimieren und erst im Rahmen der Stimulation die Genexpression hochreguliert wird und das Protein auf die Zelloberfläche transloziert wird.

Durch das Expressionsmuster sind sowohl in den WT als auch in den Munc13-4-KO CTLs der FasL gleich stark exprimiert. Die Frage ist, ob der FasL in den Munc13-4-KO CTLs im gleichen Maße auf der Zelloberfläche exprimiert ist oder ob die FasL Translokation aufgrund des Fehlens von Munc13-4 gehemmt ist. Deshalb wurden unstimulierte als auch 3 d stimulierte CD8+ T-Lymphozyten mit einem spezifischen Antikörper gegen FasL gefärbt (Abb. 39).

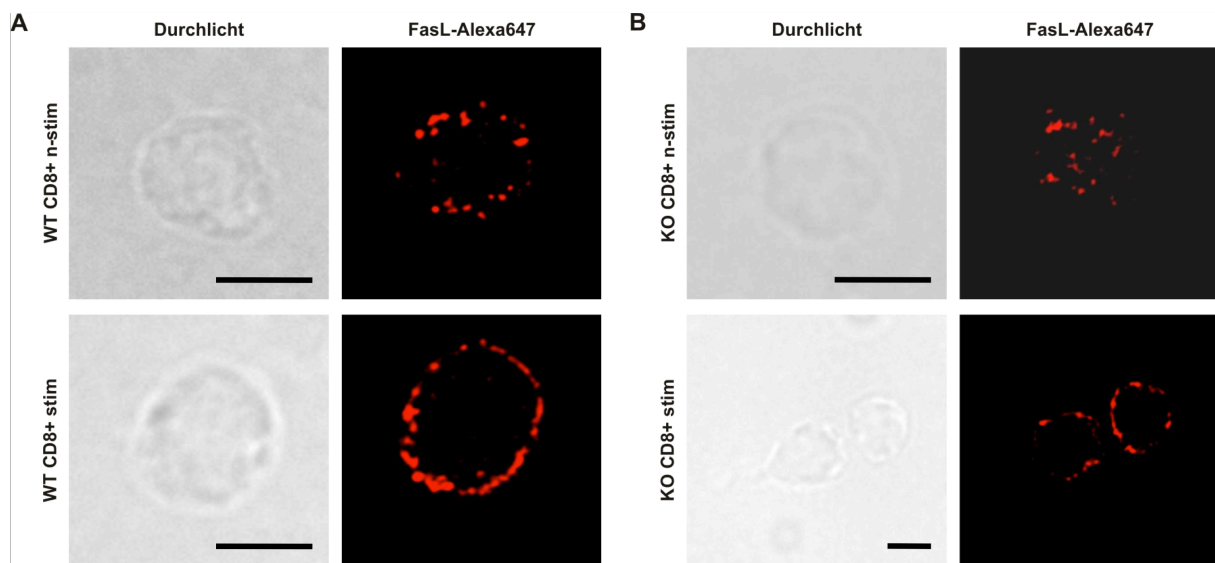


Abb. 39: FasL Expression in nicht-stimulierten im Vergleich zu stimulierten CD8+ T-Lymphozyten der WT und Munc13-4-KO Mäuse

CD8+ T-Lymphozyten, die direkt nach der Isolation wie auch 3 d stimulierte CD8+ T-Lymphozyten aus WT und Munc13-4-KO Mäuse wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton-X 100 permeabilisiert und anschließend mit einem anti-FasL Antikörper gefärbt. Die Analyse der Expression wurde am SIM durchgeführt.

Die Abb. 39 zeigt, dass die unstimulierten CD8+ T-Lymphozyten nur eine sehr geringe Fluoreszenz auf der Oberfläche aufwiesen. Dies spricht für eine geringe FasL Konzentration auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz dazu zeigten die stimulierten CD8+ T-Lymphozyten eine höhere Fluoreszenzintensität und somit eine höhere Expression. Aber die Intensität zwischen WT und Munc13-4 KO CTL ist unverändert, somit ist die Translokation des FasL nicht beeinträchtigt in den Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten.

7.6.2.3 Intrazelluläre Kalziumkonzentrationsmessungen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der CTLs und APCs während der IS-Bildung und des Abtötens nach Blockierung des Fas/FasL-Signalwegs

Nachdem bewiesen werden konnte, dass sowohl die FasL-Expression als auch die Translokation zwischen WT und Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten nicht unterschiedlich ist, wurde die Rolle von FasL bezüglich der Zytotoxizität der CTLs

untersucht. Dazu wurde der Einzelzellassay mit einem Antikörper gegen FasL, der durch Bindung an FasL die Interaktion mit Fas auf den APCs verhindert, durchgeführt. Dadurch kann nachgewiesen werden, ob die Munc13-4-KO CTLs über den Fas/FasL-Signalweg die APCs töten. Deshalb wurde die Kalziumkonzentration in den CTLs und den APCs nach Bildung der IS während der Blockierung des Fas/FasL-Signalwegs untersucht.

Anhand der Abb. 40 kann man erkennen, dass die CTLs nach Kontakt mit der APCs einem schnellen Kalziumkonzentrationsanstieg zeigten und nach ca. 100 min immer noch eine erhöhte Kalziumkonzentration aufwiesen. Diesbezüglich ist kein Unterschied zu den CTLs aus dem vorherigen Versuch zu erkennen. Der FasL-Antikörper hat somit keinen Einfluss auf den Kalziumkonzentrationsverlauf der CTLs nach IS-Bildung. Die APCs der WT Experimente zeigten nach Kontakt mit den CTLs eine stetige Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Im Vergleich dazu wiesen die APCs aus den Munc13-4-KO Experimente nur eine moderate Erhöhung der Kalziumkonzentration auf.

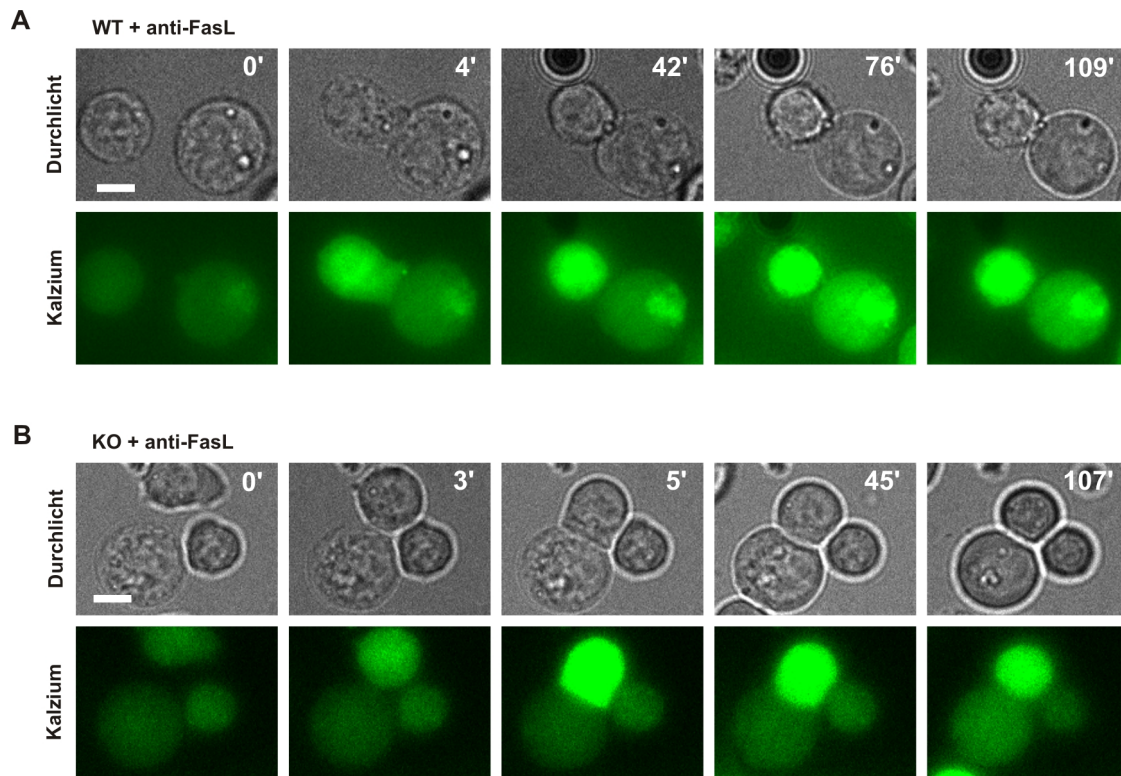


Abb. 40: Kalziumkonzentrationsmessung der CTLs aus WT und Munc13-4-KO Mäusen und APCs

A + B. Sowohl CTLs aus WT und Munc13-4-KO Mäusen als auch P815 Zellen (APCs) wurden mit Fluo-4 beladen und zusätzlich wurden die CTLs mit Alexa647-anti-CD3 Antikörper angefärbt. Nach 20 min wurden die Zellen gewaschen und zu den P815 Zellen wurde anti-CD3 Antikörper und zu den CTLs wurde anti-FasL Antikörper hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen auf ein Deckglas überführt und alle 10 s wurde ein Durchlichtbild, Fluoreszenzbild der Wellenlänge 647 nm und 488 nm aufgenommen mit Hilfe des SIM.

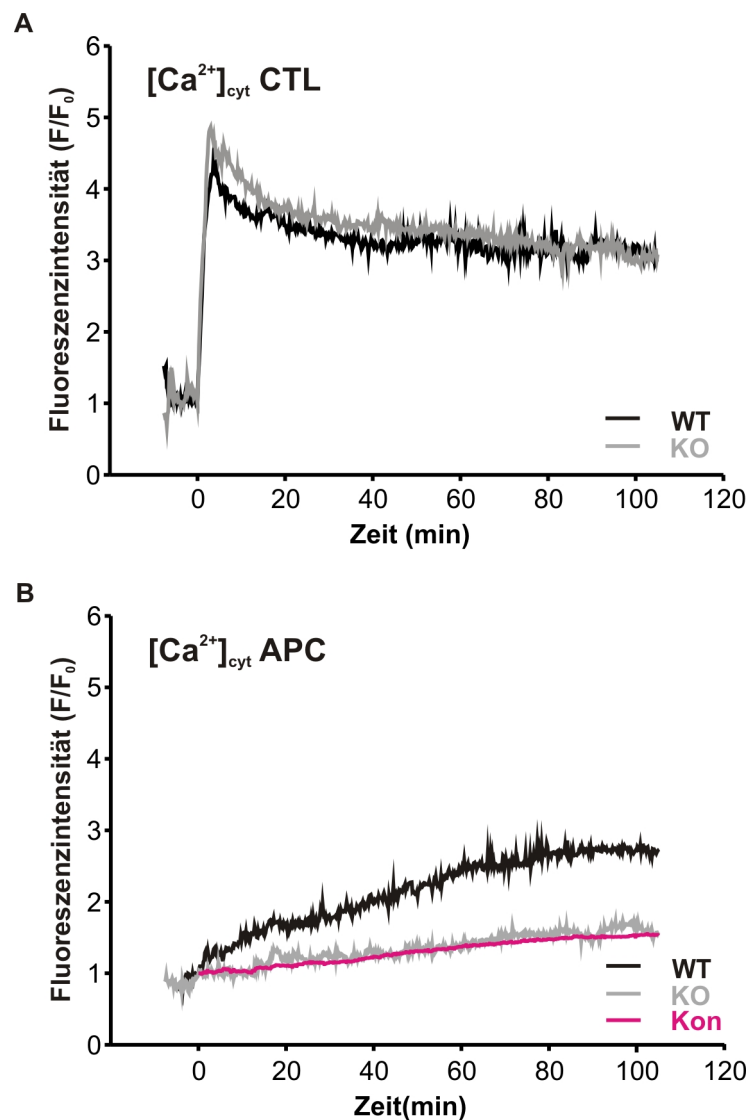


Abb. 41: Kalziumkonzentrationsverlauf nach Bildung einer IS mit WT und Munc13-4-KO CTLs und APCs während der Blockierung des Fas/FasL-Signalwegss

Intensität der Fluoreszenzmessung wurde mit Hilfe des EasyTrack Programm sowohl für die CTLs als auch für die APCs gemessen, gemittelt und in ein Diagramm auf die Zeit bezogen aufgetragen (WT: N = 5 ; n = 12 ; Munc13-4: N = 5; n = 10 ; Kon: N = 3; n = 9)

Die Fluoreszenzintensität der CTLs ist unverändert im Vergleich zu den Versuchen, bei denen der Fas/FasL-Signalweg nicht inhibiert wurde. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der Kalziumkonzentrationsanstieg durch die Interaktion des FasL mit dem Fas beeinflusst ist. Dies bedeutet, dass das Kalziumsignal ausschließlich durch die Interaktion der CTLs mit der APCs über den anti-CD3 Antikörper zustande kam. Die APCs zeigten verschiedene Kalziumkonzentrationsverläufe nachdem die IS ausgebildet wurde. So zeigten die APCs, die mit WT CTLs eine Synapse gebildet

haben, einen stetigen Anstieg des Kalziums. Allerdings ist dieser Kalziumanstieg im Vergleich zu dem Kalziumanstieg ohne Blockierung des Fas/FasL-Signalweg weitaus geringer. Dies spricht dafür, dass beide Signalwege im gleichen Maß zur Abtötung der APCs beitragen. Diese Aussage wird durch die Messung der Kalziumkonzentration in den APCs, die mit den Munc13-4-KO CTLs interagieren, unterstützt. Denn die Intensität stieg im gleichen Maß an verglichen mit der Intensität der Kontrollzellen, APCs, die keinen Kontakt zu CTLs hatten. Dadurch kann gezeigt werden, dass die Munc13-4-KO CTLs nur über den Fas/FasL-Signalweg die APCs abtöten können.

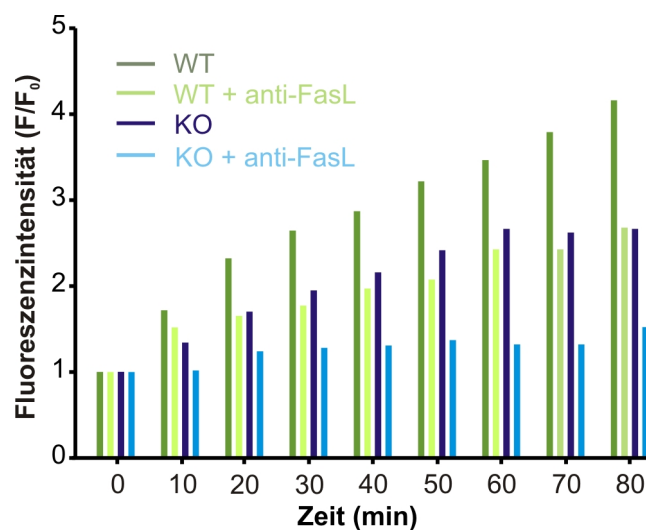


Abb. 42: Kalziumkonzentrationsverlauf der APC2 im Vergleich

Fluoreszenzintensitäten der APCs aus den WT, WT und anti-FasL-Antikörper, Munc13-4-KO und Munc13-4-KO und anti-FasL-Antikörper Experimente im Vergleich.

In Abb. 42 wird die Fluoreszenzintensitäten der APCs der verschiedenen Versuche noch einmal gegenüber gestellt. Dadurch kann man erkennen, dass die Effektivität der WT CTLs bezogen auf das Abtöten der APCs am höchsten war, was an der Fluoreszenzintensität zu erkennen ist. Sobald allerdings ein Signalweg blockiert wurde, entweder der lytische Granulen-vermittelte Signalweg in den Munc13-4-KO CTLs wie auch der Fas/FasL-Signalweg in den WT CTLs, die mit dem FasL-Antikörper inkubiert worden sind, erreichten nur geringe Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den WT Experimenten. Wurden beide Signalwege blockiert, kann man eine noch geringere Fluoreszenzerhöhung, die mit Fluoreszenzerhöhung der Kontrollzellen vergleichbar sind, erkennen. Dies bedeutet, dass jeder Signalweg 50%

des Abtötens der APCs übernimmt und sobald ein Signalweg wegfällt, ist die Effektivität der Zytotoxizität um die Hälfte herabgesetzt.

7.7 Einfluss von Munc13-4 auf die Exozytose von dens core Vesikeln in Chromaffinzellen

Es besteht die Hypothese, dass Munc13-4 ein Primingfaktor für lytische Granulen in CTLs und NKs ist. Im Gegensatz dazu sind die anderen Mitglieder der Munc13 Familie als Primingfaktoren im neuronalem System charakterisiert worden. So wurde beispielsweise Munc13-1 in glutamaterge Synapsen identifiziert und durch Untersuchungen an Munc13-1-KO Mäusen konnte gezeigt werden, dass beim Fehlen des Proteins die Vesikel an der Aktivenzone nicht gepreimt und somit nicht sezerniert werden. In Chromaffinzellen konnte Ashery et al. (2000) zeigen, dass bei Überexpression von Munc13-1 eine 3-fach höhere Exozytoserate zu erwarten ist. Somit hat Munc13-1 einen positiven Einfluss auf die Exozytose. Es stellte sich nun die Frage, ob Munc13-4 in einem anderen Zellsystem, auch die Aufgabe des Primings übernehmen kann. Dazu wurden Chromaffinzellen mit Munc13-4 überexprimiert und die Exozytose wurde mittels Kapazitätsmessung ermittelt. D. h. die Chromaffinzellen wurden im „whole cell“ Modus gepatcht und mit Kalzium, das mit NP-EGTA einen UV-instabilen Komplex bildet, perfundiert. Durch UV-Blitze wurde der Komplex zerstört und eine sehr hohe Konzentration an Kalzium wurde zytosolisch freigesetzt. Dadurch konnten die gepreimten Vesikel sehr schnell sezerniert werden. Durch die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran vergrößerte sich die Oberfläche der Zelle und die Kapazität der Zelle nahm zu. Die Kapazität ist proportional zur Zelloberfläche.

Zuerst wurden WT im Vergleich zu Munc13-4-KO Chromaffinzellen auf die Fähigkeit ihrer Exozytose hin untersucht. In Abb. 43 ist sowohl der Kalziumkonzentrationsverlauf als auch der Verlauf der Kapazität der Chromaffinzellen aufgezeichnet. Es ist zu erkennen, dass weder in der Kalziumkonzentration noch die Kapazität Unterschiede gemessen worden sind. Somit hat das Fehlen von Munc13-4 keinen Einfluss auf die Exozytose ausgeübt.

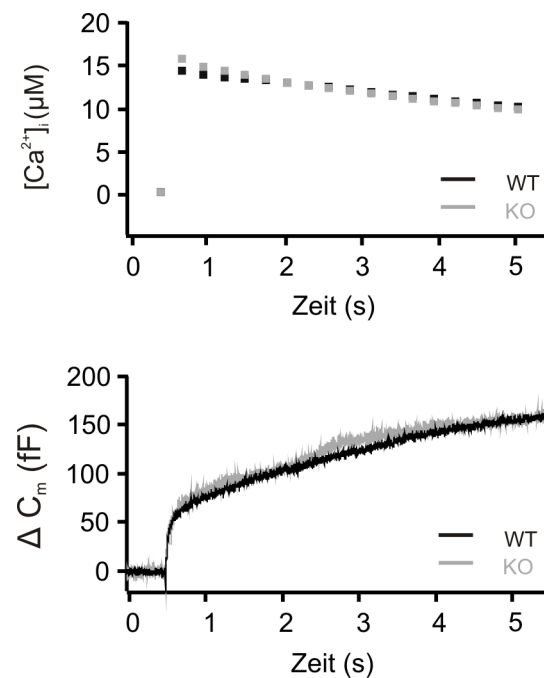


Abb. 43: Katecholaminsekretion von WT und Munc13-4-KO Chromaffinzellen

Die freie zytosolische Kalziumkonzentration und die Kapazitätsänderungen der WT und der Munc13-4 KO Chromaffinzellen vor und nach UV-Blitze (WT: N = 7; n = 14 und KO: N = 3; n = 6).

Nachdem das Fehlen von Munc13-4 keine Auswirkung auf die Exozytose von Katecholaminen aufwies, wurde die Wirkung von exogenem Munc13-4 in WT Chromaffinzellen untersucht. WT Chromaffinzellen wurden mit Hilfe eines Semliki-Forest-Virus, das die Sequenz von Munc13-4 enthielt, infiziert und nach 4 h Inkubation wurde die Kapazitätsänderung als Antwort auf die plötzliche Kalziumkonzentrationserhöhung aufgrund des UV-Blitzes gemessen. Wie aus Abb. 44 zu erkennen ist, ist hier nur ein geringfügiger Unterschied sowohl bei der Kalziumkonzentrationsmessung als auch bei der Kapazitätsmessung als Antwort auf den UV-Blitz ermittelt worden. Somit kann gezeigt werden, dass überexprimiertes Munc13-4 keine Auswirkung auf die Exozytose aufwies. D. h. Munc13-4 kann nicht als Primingfaktor in einem anderen Zelltyp fungieren.

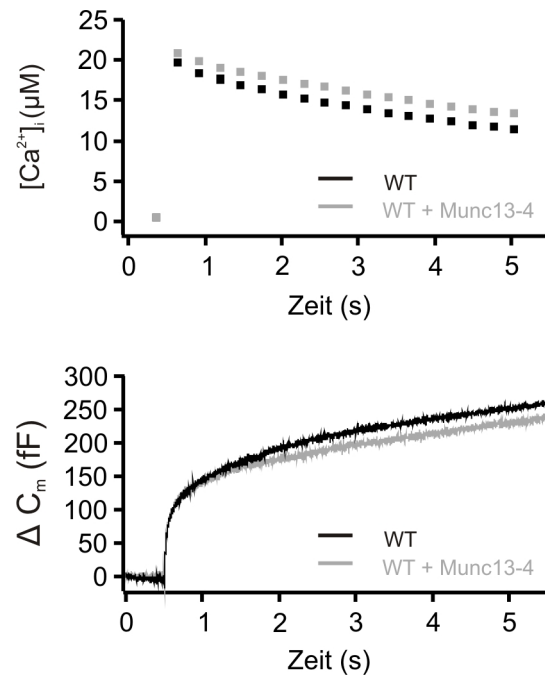


Abb. 44: Katecholaminsekretion von WT und Munc13-4 infizierten WT Chromaffinzellen

Die freie zytosolische Kalziumkonzentration und die Kapazitätsänderungen der WT und der überexprimierten Munc13-4 Chromaffinzellen vor und nach UV-Blitze (WT: N = 5; n = 16 und KO: N = 4; n = 10).

8. Diskussion

8.1 Jinx-Maus als FHL 3 Modell

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an einer Munc13-4-defizienten Mauslinie durchgeführt, um eine seltene aber lebensbedrohliche Erkrankung (FHL) näher zu untersuchen. Die Ursache für diese Erkrankung ist auf eine Punktmutation im Munc13-4 Gen zurück zuführen. Diese Mutation führt dazu, dass die CTLs und NKs keine zytotoxischen Proteine sezernieren können, was zu einer Überreaktion der Histiozyten und Lymphozyten führt (Risma and Jordan, 2011; Weitzman, 2011).

Die Jinx-Maus wurde durch Applikation eines chemischen Mutagens erzeugt. Als Folge besitzt diese Mauslinie einen Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) im Intron 26 des Munc13-4 Gens, welches zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führt (Crozat et al., 2007). Allerdings ist bisher noch nicht bewiesen worden, ob das verkürzte Protein, das noch die erste C2- und die erste MHD- und ein Teil der zweiten MHD-Domäne beinhaltet, vorhanden ist und aufgrund der Verkürzung die Funktion verloren hat oder ob dies durch eine veränderte Faltungsstruktur des Proteins hervorgerufen wird. Die Jinx-Maus ist sowohl als *in vivo* und auch als *in vitro* Modell nach Aufreinigung von isolierten CD8⁺ T-Lymphozyten geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Maus in erster Linie als *in vitro* Modell benutzt. Um die Sekretion der CD8⁺ T-Lymphozyten *in vitro* untersuchen zu können, wurden die isolierten CD8⁺ T-Lymphozyten mittels anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper polyklonal zu Effektorzellen aktiviert (Frauwirth and Thompson, 2007; Trickett and Kwan, 2003; Yamada-Ohnishi et al., 2004). Dieses Vorgehen ist im allgemeinen üblich, wenn ausschließlich die Untersuchungen auf zellulärer Ebene stattfinden, wie z.B. Lokalisationsstudien, Ca²⁺-Messungen, Sekretionsmessungen von zytotoxischen Proteinen usw.

Als *in vivo* Modell besitzt die Jinx-Maus eine Überempfindlichkeit gegenüber dem Maus Zytomegalievirus (MCMV), die eine unkontrollierte Proliferation des Virus erlaubt und dadurch zum Tod führt. Die aktivierten NKs und CTLs sezernieren keine lytischen Granulen, obwohl die Fähigkeit der Zytokinproduktion erhalten bleibt und die Zytokinwerte im Blut der infizierten Mäusen drastisch erhöht sind. Sechs Tage nach der Infektion sterben die Jinx-Mäuse - im Gegensatz dazu überleben die WT-Mäuse. Da die Jinx-Mäuse aufgrund der hohen Toxizität des MCMV Virus sterben,

musste ein Virus mit reduzierter Toxizität benutzt werden, um den Phänotyp der HLH zu entwickeln. Mäuse, die mit dem lymphozytischen Choriomeningitisvirus (LCMV) infiziert worden sind, lösen die klinischen Symptome der HLH aus und es entsteht eine Hyperaktivität der CTLs und NKs. So zeigen die LCMV infizierten Mäuse nach 12 Tagen einen erniedrigten Hämatokritwert, eine erniedrigte Thrombozytenanzahl und eine erhöhte Neutrophilenanzahl. Außerdem weisen die Jinx-Mäuse eine vergrößerte Milz und drastisch erhöhte IFN- γ Werte im Serum auf. Zusätzlich ist eine erhöhte Anzahl von Granulomen in Milz und Leber zu verzeichnen (Croizat et al., 2007).

Um die Funktion der CTLs möglichst unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, mussten die Mäuse mit dem LCMV Virus infiziert werden (Zinkernagel and Doherty, 1974; Lehmann-Grube et al., 1985). Dadurch wurden die Symptome der FHL 3 in den Jinx-Mäusen ausgelöst, d. h. erhöhte Zytokinwerte, die Einfluss auf die Aktivierung der CTLs als auch auf die Makrophagen haben und somit eine Überreaktivität der CTLs und Makrophagen hervorrufen. In dieser Arbeit wurden die Mäusen mit dem LCMV infiziert und nach einer Inkubationszeit von 8 Tagen wurden die Lymphozyten isoliert und für den ^{51}Cr -Freisetzungssassay eingesetzt. Dadurch konnte die Funktionsweise der CTLs hinsichtlich der Abtötung der APCs unter physiologischer Aktivierung untersucht werden.

8.2 Transkription und Expression von Munc13 Isoformen

Wir konnten zeigen, dass außer Munc13-4 noch Munc13-1 und eine Spleißvariante von Munc13-2, die ubiquitäre Spleißvariante (ubMunc13-2), in CD8⁺ T-Lymphozyten transkribiert werden. Der Befund, dass Munc13-1 in CD8⁺ T-Lymphozyten transkribiert wird, ist von besonderer Bedeutung, da Munc13-1 die Hauptform dieser Proteinfamilie in neuronalen Zellen ist und dort als Primingfaktor essentiell ist (Ashery et al., 2000). Eine mögliche Expression von Munc13-1 in CTLs könnte darauf hindeuten, dass Munc13-1 in diesen Zellen Munc13-4 bezüglich der Funktion ersetzen könnte. Deshalb haben wir versucht Munc13-1 auf Proteinebene mittels Western Blot in CD8⁺ T-Lymphozyten nachzuweisen. Dies ist uns nicht gelungen, was zum einen daran liegen könnte, dass die endogene Konzentration an exprimiertem Munc13-1 unter der Nachweisgrenze des verwendeten Antikörpers im

Western Blot liegt. Wobei allerdings die Proteinmenge dann sehr gering sein müsste, da wir relativ hohe Gesamtproteinkonzentrationen eingesetzt haben. Zum anderen könnte die fehlende Detektion auch aufgrund einer geringen Affinität des Antikörpers zum Munc13-1 Proteins die Ursache sein.

Die Fragestellung nach einer endogenen Funktion von Munc13-1 in CTLs ließe sich durch weiterführende Experimente klären, in denen durch die Verwendung von siRNAs versucht wird, die Proteinkonzentration von Munc13-1 zu dezimieren. Die Erwartung wäre, dass bei erfolgreichem siRNA-Einsatz in funktionellen Experimenten (Killingassay, Granzym B ELISA, Degranulationsassay), vor dem genetischen Hintergrund der Jinx-Maus, die von uns gefundene Restaktivität der Zellen weiterhin abnimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden solche Experimente allerdings zunächst nicht durchgeführt, weil mehrere Gründe dagegen sprachen.

Zunächst ist die Hemmung der Proteinexpression durch siRNA sehr variabel (40 - 90%, basierend auf den Erfahrungen in der Arbeitsgruppe), so dass die Restsynthese und die Restaktivität von Munc13-1 noch zu hoch ist, um Unterschiede im Experiment wahrnehmen zu können. Des Weiteren ist die Transfektionsrate der siRNA zwar höher als die Transfektionsrate von Expressionsvektoren (< 20 %), allerdings wird auch hier keine hundertprozentige Transfektionsrate erreicht. Dieses Defizit könnte durch Benutzung sogenannter siRNA-Plasmide umgangen werden. Diese Plasmide enthalten sowohl die Sequenz für die siRNA als auch eine Sequenz, die für ein Fluoreszenzprotein (wie GFP) kodiert. Dadurch können die transfizierten Zellen in der Durchflusszytometrie erkannt und analysiert werden. Aber auch hier ist durch die Variabilitäten in der siRNA-Synthese keine hundertprozentige Reduktion des Munc13-1 Proteinlevels zu erreichen. Zudem kann kein Nachweis der Abnahme der Proteinkonzentration in den CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgen, da die endogene Munc13-1 Proteinkonzentration nicht detektiert werden kann. Die siRNA kann zwar an einem anderen Zelltyp kontrolliert werden, aber man kann nicht mit Gewissheit den Zeitpunkt, der geringsten Proteinkonzentration, d. h. zu dem Zeitpunkt an dem die siRNA ihre Funktion voll entfaltet hat und die bereits synthetisierten Proteinmoleküle aufgrund ihrer Halbwertszeit abgebaut worden sind, in den CD8⁺ T-Lymphozyten definieren.

Die Verwendung von Munc13-1-KO Tieren zur Prüfung der Funktion von Munc13-1 in CTLs bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten erschien uns ebenfalls wenig erfolgversprechend, da diese Mäuse nicht lebensfähig sind und somit können keine CD8⁺

T-Lymphozyten aus adulten Tieren isoliert werden. Es können zwar embryonale CD8⁺ T-Lymphozyten gewonnen werden, aber um eine angemessene Anzahl an CD8⁺ T-Lymphozyten für die Funktionsanalyse zu erhalten, müsste jedoch eine enorme Anzahl an Munc13-1-KO Embryonen präpariert werden. Das Hauptproblem besteht allerdings darin, dass die Funktion der CD8⁺ T-Lymphozyten aus Embryonen Unterschiede zu adulten CD8⁺ T-Lymphozyten aufweisen, da bei den Embryonen ein unreifes Immunsystem vorliegt. Die Reifung der CD8⁺ T-Lymphozyten beginnt erst zu einem späteren Zeitpunkt.

So blieben zunächst die geschilderten „gain of function“ Experimente in denen Munc13-1 in Jinx-Mäuse überexprimiert wurde. Diese Experimente zeigen, dass Munc13-1 zumindest prinzipiell die Funktion von Munc13-4 übernehmen kann. Eine solche funktionelle Redundanz zwischen Munc-Proteinen wurde auch schon in früheren Arbeiten beschrieben. Varoqueaux et al. (2002) generierten eine Munc13-2-KO und eine Munc13-1/2-DKO Maus und führten elektrophysiologische Experimente an individuellen autaptischen hippocampalen Neuronen durch. Sie konnten zeigen, dass durch einen Ausfall von Munc13-2 die exzitatorischen postsynaptischen Ströme nicht beeinflusst werden. Allerdings bei Verwendung der Munc13-1/2-DKO Neuronen unterblieb die Signalantwort gänzlich. Dieses Ergebnis wurde auch an inhibitorischen postsynaptischen Strömen gemessen. Dadurch kann geschlossen werden, dass Munc13-1 die Funktion von Munc13-2 in den Munc13-2-KO Zellen übernehmen kann.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 Isoformen ausschließlich in neuronalen Strukturen zu finden sind (Augustin et al., 1999; Brose et al., 1995). Mittlerweile konnte auch diese Isoformen in andere Gewebestrukturen nachgewiesen werden (Song et al., 1998; Schmitz et al., 2001; Goldenberg and Silverman, 2009; Evans et al., 2009; Davis and Dickey, 2008). Mori et al. (2011) konnten Munc13-1 kolokalisiert mit TNF- α gefüllten Vesikel in Makrophagen identifizieren. Durch siRNA konnte die Munc13-1-Proteinkonzentration so stark reduziert werden, dass dies einen negativen Einfluss auf die TNF- α -Sekretion zur Folge hat. Aber auch bei der Insulinausschüttung aus Langerhansche Inselzellen ist Munc13-1 und Munc13-2 von Bedeutung (Sheu et al., 2003; Kwan et al., 2006; Kang et al., 2006).

Dies könnte daraufhin deuten, dass Munc13-1 auch in den CD8⁺ T-Lymphozyten bei der Sekretion von Zytokinen, wie IFN- γ oder TNF- α als Primingfaktor eine Rolle spielt.

Zusammenfassend kann man die Hypothese entwickeln, dass Munc13-1 möglicherweise in CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert wird und dort die Funktion von Munc13-4 übernehmen kann. In wieweit dies *in vivo* der Fall ist, ist zur Zeit noch unklar. Die Redundanz von Munc13-1 und Munc13-4 bezogen auf die Funktion der CTLs kann aber auf jeden Fall als Ansatzpunkt für eine genetische Therapie der FHL 3 liefern. Dazu müsste es gelingen, die endogene Expression von Munc13-1 in den CTLs zu erhöhen. Das Ziel wäre, dass die zytotoxische Funktion, wie in unseren Rescue-Experimenten gezeigt, wieder aufgenommen werde.

8.3 Charakterisierung der immunologischen Synapse

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die IS aus drei distinkten Bereichen besteht (Huppa and Davis, 2003; Potter et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001; Beal et al., 2008). Im Zentrum befindet sich der cSMAC, in diesem sind vor allem der TCR und CD28-Moleküle lokalisiert (Monks et al., 1998; Dustin et al., 1998; Nocross, 1984). Um diesen Bereich ist ein ringförmiger Bereich, der pSMAC, mit den Integrinen, auch als Adhäsionsmoleküle bekannt, angeordnet. Dieser Ring wird von einem weiteren Ring umgeben, dem dSMAC, der Proteine mit großen Ektodomänen beinhaltet. Lange Zeit wurde angenommen, dass diese Struktur verantwortlich ist für ein lang anhaltendes TCR-Signal. Aber Alarcón et al. (2011) konnte zeigen, dass diese ringförmige Struktur bei der IS mit dendritischen Zellen als APCs nicht vorhanden ist. Außerdem konnten sie zeigen, dass die TCR-Signale in Mikroclustern im dSMAC detektiert wurden und die Signaltransduktion gestoppt wird so bald die TCR den cSMAC erreicht haben. Zusätzlich konnten sie beweisen, dass die Bildung des cSMAC für die Signaltransduktion ausgehend vom TCR und die T-Zell-aktivierung nicht erforderlich ist. Vielmehr ist die Strukturierung des cSMAC für die down-Regulierung der TCRs und dadurch für die Polarisierung der lytischen Granulen verantwortlich.

Neben der Umorganisation der Oberflächenproteine kommt es auch in der CTL zur Umorganisation der Zellstrukturen und Organellen. Dabei polarisiert das Mikrotubuli-

organisationszentrum der CTLs zur Kontaktzone und Granulen bewegen sich entlang der Mikrotubuli in minus-End Richtung zum polarisierten Mikrotubuliorganisationszentrum. Dementsprechend werden die plus-End Mikrotubulimotoren und Aktin für die Sekretion nicht gebraucht (Stinchcombe et al., 2006). Stattdessen bewegt sich das Zentrosom zur Plasmamembran und tritt mit dieser in Verbindung. Die Synapse kann so über Stunden stabil bleiben (Lee et al., 2003, Mempel et al., 2004; Shakhar et al., 2005); dies wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet. Diese Stabilität der IS über einen längeren Zeitraum konnte anhand der Tubulinfärbung gezeigt werden. Die Struktur des typischen MTOC ist auch noch nach 4 h polyklonaler Stimulation mittels anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern deutlich zu erkennen. Dennoch ist die Struktur über diesen langen Zeitraum nicht mehr so gut erhalten als die MTOC und Tubulinorganisation nach 20 minütiger Stimulation. Dies legt nahe, dass die Synapse zwar über Stunden stabil ist, die sekretorischen Prozesse allerdings innerhalb von Minuten abgeschlossen sind und vermutlich die regulatorischen Prozesse noch längere Zeit nach der Degranulation der lytischen Granulen ablaufen, wie das auch in der Literatur postuliert wird (Scholer et al., 2008).

8.4 Untersuchung der Sekretionsereignisse in den CD8+ T-Lymphozyten

Die wichtigste Aufgabe, die die CTLs übernehmen, ist das Abtöten der APCs. Dies kann über zwei Wege geschehen. Zum einen über den lytischen Granulenvermittelten Weg und zum anderen über den Fas/FasL-Signalweg (Henkart and Sitkovsky, 1994). Um den lytischen Granulenvermittelten Signalweg zu untersuchen, wurde die Sekretion der lytischen Granulen genauer betrachtet. Zum einen wurde die Sekretionsleistung von Granzym B in den WT und den Munc13-4-KO CTLs untersucht. Es wurde festgestellt, dass das Fehlen von Munc13-4 eine drastische Reduktion der Sekretion von Granzym B zur Folge hat. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass unter gleichen Bedingungen bereits die Gesamtkonzentration an Granzym B in den Munc13-4-KO CTLs ebenfalls reduziert war. Diese geringere Synthese von Granzym B kann aber nicht der Grund für die geringere Sekretion von Granzym B sein, da die geringere Synthese über den Verlauf des Experiments kompensiert wurde. D. h. nach 4 h Inkubation mit anti-CD3/CD28 Antikörper beschichteten Beads ist die Synthese von Granzym B der Munc13-4-KO CTLs zwar

immer noch niedriger, aber nicht mehr signifikant niedriger. Diese Reduktion der Sekretion der lytischen Granulen wurde auch in den CTLs der FHL 3 Patienten nachgewiesen (Feldmann et al., 2003; Crozat et al., 2007).

Um den Munc13-4-Sekretionsdefekt besser untersuchen zu können, wurde ein Degranulationsassay durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der Detektion von einem lysosomenassoziierten Membranprotein (Lamp-1). Antikörper, die gegen Lamp-1 gerichtet und mit einem Fluorophor gekoppelt sind, binden an die Lamp-1-Moleküle auf der Oberfläche der Zelle und werden durch das gebundene Fluorophor detektierbar. Dadurch wird indirekt die Sekretion von Lysosomen gemessen, da nur durch den Prozess der Sekretion Lamp-1, das im Innern der Lysosomen an die Vesikelmembran gebunden ist, an die Oberfläche der Zelle gelangen kann. Somit ist die Aussagekraft der Messmethode bezüglich der Sekretion der lytischen Granulen kritisch zu bewerten, da die lytischen Granulen nur eine Subpopulation der Lysosomen darstellen. In Korrelationsmessungen konnte allerdings nachgewiesen werden, dass eine hohe Korrelation zwischen dem hier angewendeten Lamp-1 Degranulationsassay und dem sogenannten TDA (2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylic acid) Freisetzungassay (TDA Release Assay (TRA)) besteht. Diese TRA Methode basiert auf einem Killing Assay, bei dem die Zielzellen mit einem Azetomethylester eines fluoreszierenden verstärkenden Liganden (BATDA) geladen werden. Nach Lyse der Zielzellen wird TDA freigesetzt und mit Europium versetzt, dadurch wird ein fluoreszierendes stabiles Chelat (EuTDA) gebildet. Die Fluoreszenz ist mit der Lyse der Zielzellen proportional (Blomberg et al., 2004). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Sensitivität mit dem Chromiumfreisetzungassay vergleichbar ist. Die Zytotoxizität und die Expression von Lamp-1 auf der Oberfläche von NKs war linear. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die im Lamp-1 Assay erfasste Sekretion durch zytotoxische Vesikel verursacht wurde.

Des Weiteren konnte Crozat et al. sowohl in NKs als auch in CD8+ T-Lymphozyten eine erniedrigte Degranulation der Lamp-1-gekoppelten Vesikel in Jinx-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen zeigen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die NKs einen Defekt der Zytotoxizität in der Jinx-Maus aufweist. Dieses Ergebnis bekräftigt ebenfalls die Korrelation des Degranulationsassay und der Zytotoxizität.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Degranulationsdefekt in Jinx-CD8+ T-Lymphozyten durch die Überexpression sowohl von Munc13-4 als auch von Munc13-1 kompensiert werden kann. Somit konnte bewiesen werden, dass eine

andere Isoform der Munc13 Familie die Funktion übernehmen kann. Munc13-1 besitzt alle Domänen, die auch in Munc13-4 enthalten sind und zusätzlich noch eine C1-Domäne. Diese Domäne bindet DAG und wird mit Hilfe dieser Verbindung an die Plasmamembran transloziert. Im Gegensatz dazu besitzt Munc13-4 diese Domäne nicht, ist aber trotzdem nach der Aktivierung an der Membran lokalisiert. Die Translokation von Munc13-4 geschieht möglicherweise durch Interaktionen mit sogenannten Transportproteinen (wie z.B. Dyneine → aus der Peripherie zum MTOC, Kinesine → vom MTOC zur Peripherie), diese können Proteine entweder direkt oder indirekt an die Membran translozieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Munc13-4 an Rab27a bindet und es ist bekannt, dass die Proteine der Rab-Familie an Transportproteine binden, so dass ein Rab27a-vermittelter Transport von Munc13-4 wahrscheinlich ist (Kurowska et al., 2012; Sanchez-Ruiz et al., 2011; Jordens et al., 2005).

Die Überexpression von Munc13-1-GFP in Chromaffinzellen führt zu einer zytosolischen Verteilung des Proteins, erst nach Zugabe eines Phorbolesters (ein DAG Analogon) wird Munc13-1 an die Plasmamembran transloziert (Ashery et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass überexprimiertes Munc13-1 in CD8+ T-Lymphozyten sich genauso verhält. Physiologischer Weise wird DAG durch Aktivierung von TCR gebildet. Das heißt, im Rahmen physiologischer Prozesse kann es zu der im Experiment beobachteten Translokation von Munc13-1 kommen, was die bereits geschilderte Hypothese zu einer möglichen Funktion von Munc13-1 in CD8+ T-Lymphozyten zusätzlich stützen kann. Konsequenter Weise sollte die durch DAG induzierte Translokation von Munc13-1 an die Membran dann auch zu einer gesteigerten Sekretion führen. Dies war jedoch in eigenen Experimenten wie auch in publizierten Arbeiten nicht der Fall (O'Flaherty et al., 1989). Als Grund dafür könnte sein, dass ein Nebeneffekt eine negative Wirkung auf die Degranulation besitzt. So konnte O'Flaherty et al. (1988) zeigen, dass Neutrophile nach Stimulation der PKC mit PMA verschiedene Enzyme, die in unterschiedlichen Granulen verteilt sind, sezernieren. Allerdings spielt die Dosis von PMA eine große Rolle, ob der positive Haupteffekt oder der negative Nebeneffekt überwiegt. So hatte eine Konzentration von 0,16 – 1,6 nM PMA eine verstärkende Wirkung und ab eine Konzentration von über 5 nM PMA eine inhibierende Wirkung auf die Degranulation. Dies könnte auf verschiedene Effekte zurückgeführt werden. Zum einen können höhere Konzentrationen von PMA eine PKC-induzierte Rezeptorinaktivierung, eine

Rezeptorinternalisation oder eine Interferenz mit Rezeptoreninteraktionen mit N-Proteinen zur Folge haben (Friedman et al, 1984; Lynch et al., 1985; King and Cuatrecasas, 1982; Matsumoto et al, 1986). Somit konnte gezeigt werden, dass die PMA-Applikation keine positive Auswirkung auf die Degranulation von Lysosomen in den CD8⁺ T-Lymphozyten bewirkt, sondern im Gegenteil der Nebeneffekt von PMA in einer Konzentration von 100 nM enorm überwiegt.

8.5 Morphologische Untersuchungen der CTLs nach Bildung einer IS mittels CD3/CD28 Antikörper beschichteten Deckgläschen

Die IS-Bildung findet nach der Erkennung des MHC I-Komplexes und anschließender Signaltransduktion statt. Außerdem können zusätzlich kostimulatorische Faktoren die Signaltransduktion modulieren. Die wesentliche Proteinstruktur des TCR, die die Signalkaskade zur Etablierung der IS in Gang setzen, ist der sogenannte CD3-Komplex. Im Experiment reicht es aus, den CD3-Komplex zusammen mit einem kostimulatorischen Rezeptor (CD28) durch spezifische Antikörper (CD3- und CD28-Antikörper) zu aktivieren und die IS wird gebildet. Bei der Ausbildung der IS wird nicht nur die Kontaktzone zwischen den T-Lymphozyten und der APC umorganisiert, sondern auch strukturelle Moleküle werden neu ausgerichtet. So wird beispielsweise das MTOC und die Tubulinstrukturen in Richtung der Synapse arrangiert, so dass die lytischen Granulen und andere Proteine anhand dieser Strukturen zur IS transportiert werden können (Geiger et al., 1982; Kupfer and Dennert, 1984; Yanelli et al., 1986). Durch diese strukturelle Umorientierung ist ein gerichteter Transport möglich. In dieser Arbeit konnte anhand der Tubulinstrukturen als auch der Einzelzellassays gezeigt werden, dass eine geformte IS über Stunden stabil bleibt. Dies wurde schon in vorherigen Arbeiten gezeigt, allerdings ist bis heute unklar welche Funktion die anhaltende IS-Formation hat. Für den eigentlichen Tötungsmechanismus werden mehrere Minuten gebraucht, deshalb wird spekuliert, dass die andauernde IS für die Differenzierung der CD8⁺ T-Lymphozyten zur CD8⁺ Gedächtniszellen beiträgt und nichts mit einer Freisetzung zytotoxischer Proteine zu tun hat. Allerdings konnte in vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nach 4 Stunden Stimulation mit CD3/CD28 Antikörpern mehr Granzym B ausgeschüttet wurde als nach 1 Stunde Stimulation. Dies könnte allerdings auf ein fehlendes Stop-Signal, beispielweise fehlende

Internalisierung des TCR, das *in vivo* von der APC erzeugt wird, zurückgeführt werden. Dies wurde zum Anlass genommen die morphologischen Untersuchungen an 4 Stunden stimulierten Zellen vorzunehmen, da dann die Wahrscheinlichkeit höher ist, eine größere Ansammlung lytischer Granulen in Munc13-4-KO CTLs zu finden. Es konnte anhand der Analyse der elektronischen Mikroskopieaufnahmen gezeigt werden, dass die Anzahl der lytischen Granulen in Munc13-4-KO CTLs höher ist als in WT CTLs.

8.6 Zytotoxizität der WT und Munc13-4-KO CTLs

Zwei Signalwege für die Abtötung der APCs sind bekannt. Zum einen handelt es sich um den durch lytischen Granulen-vermittelten Signalweg und zum anderen um den Fas/FasL-Signalweg. Allerdings ist bisher völlig unklar, welcher Signalweg in physiologischer Hinsicht der Abtötung der APCs und Tumorzellen von Relevanz ist. Bis heute wird dieses Thema kontrovers diskutiert. In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass die Abtötung der APCs über den Perforin-Granzym-Signalweg, der bevorzugte Weg ist. Kägi et al. (1996) konnte zeigen, dass perforindefiziente Mäuse, die mit dem LCMV infiziert wurden, den Virus nicht bekämpfen können. Dies steht im Gegensatz zu WT-Mäusen, die vor allem aufgrund der CTL-Funktion, infizierte Zellen abtöten und somit den Organismus von dem Virus befreien können. Aber auch tumorinfizierte Zellen werden in einem geringeren Maße in perforindefiziente Mäusen abgetötet als in WT-Mäusen (van Broek et al., 1996; Walsh et al., 1994). Daraus wird geschlossen, dass der lytische Granulen-vermittelte Signalweg sowohl bei der Abwehr bzw. Bekämpfung der Tumorzellen, als auch bei einer Virusinfektion von größter Bedeutung ist. Allerdings konnten Kägi et al. (1994) in früheren Publikationen schon nachweisen, dass der Fas/FasL-Signalweg in der Bekämpfung einer Virusinfektion eine sehr ähnliche Relevanz hat. Dieser These stehen zwei Publikationen von Takahashi et al. (1994) und Watanabe-Fukunaga et al. (1992) gegenüber, die besagen, dass es durch Abwesenheit der FasL auf den Lymphozyten zu einer lymphozytären Proliferationserkrankung kommt und somit dem Fas/FasL-Signalweg eine in der Homöostase der Lymphozyten große Bedeutung zu kommt und nicht bei der Bekämpfung von Pathogenen. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass bei einer polyklonalen

Stimulation der CD8⁺ T-Lymphozyten die APCs zu etwa 50% über den lytischen Granulen-vermittelten Signalweg abgetötet werden und die anderen 50% der APCs über den Fas/FasL-Signalweg. Dies konnte durch die Blockierung der jeweiligen Signalwege ermittelt werden. Allerdings konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob diese Aufteilung des Killingmechanismus auf beide Signalwege aufgrund der nicht-physiologischen Stimulation besteht. Ein möglicher Artefakt könnte in der abnormalen hohen Expression von Zytokinen vorliegen, die bei einer *in vitro* Stimulation mit CD3- und CD28-Antikörper und zugesetztem rekombinanten IL-2 vorkommen kann. Es ist bekannt, dass diese hohe Zytokinonzentration eine veränderte Expression und Translokation des FasL zur Plasmamembran zur Folge haben könnte.

Die Tatsache, dass Munc13-4-KO CTLs trotz fehlender Sekretion der lytischen Granulen die APCs abtöten können und zwar über den Fas/FasL Signalweg. Daraus kann man schließen, dass die Translokation von FasL in die Plasmamembran in den T-Lymphozyten nicht über Munc13-4 vermittelt wird. Da die Munc13-4-KO CD8⁺ T-Lymphozyten über den Fas/FasL-Signalweg APCs abtöten können. Dies widerlegt allerdings die Postulierungen von Bossi et al. (1999) und Blott and Griffiths (2002), welche besagen, dass Munc13-4 auch eine Rolle bei der Fusion von Vesikeln, die FasL beinhalten, spielt. Diese Hypothese wird allerdings von He and Ostergaard (2010) widerlegt; sie konnten mittels Kollokalisationsstudien zeigen, dass FasL in anderen Granulen lokalisiert sind als in lytische Granulen.

8.7 Einfluss von Munc13-4 auf die Exozytose von dens core Vesikel in Chromaffinzellen

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl Munc13-4 eine Rolle bei der Exozytose von lytischen Granulen in T-Lymphozyten als auch Munc13-1 eine Rolle bei der Sekretion von dense core Vesikeln im neuronalem System spielt (Croizat et al., 2007; Feldmann et al., 2003; Augustin et al., 1999) . Allerdings konnte nur im Fall von Munc13-1 bewiesen werden, dass dieses Protein einen wichtigen Schritt im Primingprozess beschleunigt (Brose et al., 2000). So wird im Fall von Munc13-4 spekuliert, ob auch dieses Protein aufgrund seiner sehr ähnlichen Struktur zu Munc13-1 dieselbe Funktion in den CTLs einnimmt. Des Weiteren zeigten Stevens et

al. (2005), dass für die Sekretion nur die sogenannte Mun-Domäne, die aus den zwei MHDs und der zweiten C2-Domäne (1100 - 1739 Aminosäuren) besteht, essenziell ist. Dies ist somit die Minimalstruktur, die notwendig ist, um die Sekretion von dense core Vesikeln in Chromaffinzellen zu erhöhen. Da diese Domänen in Munc13-4 ebenfalls enthalten sind, stellt sich die Frage, ob Munc13-4 die Funktion von Munc13-1 in den Chromaffinzellen übernehmen kann. Um diese Frage aufzuklären, wurde Munc13-4 in Chromaffinzellen überexprimiert und anhand von Kapazitätsmessungen wurde die Sekretion indirekt gemessen. Es stellte sich heraus, dass Munc13-4 keinen Einfluss auf die Exozytose besitzt. Auch Munc13-4-KO Chromaffinzellen zeigten keine Unterschiede bezüglich der Sekretion von dense core Vesikeln im Vergleich zu WT Chromaffinzellen. Dies lässt den Schluss zu, dass die geringe abweichende Aminosäurehomologie zwischen Munc13-4 und Munc13-1 – die Homologie ist ca. 80 % - einen großen Einfluss auf die Interaktionen von anderen Proteinen, die am Primingprozess ebenfalls beteiligt sind, hat (Koch et al., 2000). Dies könnte daraufhin weisen, dass der Mechanismus des Primings zwar ähnlich ist, aber nicht völlig identisch. Diese möglichen unterschiedlichen Mechanismen ergeben sich auch aus der Funktionalität der beiden Zelltypen. Zum einen werden die Katecholamine durch einen Kalziumtrigger innerhalb von Millisekunden aus der Chromaffinzelle hinausbefördert, wohingegen die CTLs Minuten brauchen bis die IS geformt ist, lytische Granulen zur IS polarisiert sind und schließlich mit der Plasmamembran verschmelzen, um die zytotoxischen Proteine zu sezernieren. Diese Hypothese wird durch die Resultate des Degranulationsassays mit PMA untermauert. Durch die Applikation von PMA in Chromaffinzellen kann die Sekretion der dense core Vesikel, aufgrund der zusätzlichen Aktivierung von Munc13-1 und der PKC, erhöht werden (Ashery et al., 2000; Nagy et al., 2006; Nofal et al., 2007; Zhang et al., 2008). Dahingegen lässt sich keine Erhöhung der Lamp-1 Degranulation der Munc13-1 überexprimierten Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten nach Applikation von PMA im Vergleich zu Munc13-1 überexprimierten Munc13-4-KO CD8+ T-Lymphozyten ohne Applikation von PMA erzielen. Um die Unterschiede der verschiedenen Mechanismen klar definieren zu können, müssten weitere Experimente, wie beispielsweise Vesikelanalysen (Bewegung, Sekretion) an der Plasmamembran mittels TIRF-Mikroskopie, durchgeführt werden.

9. Literatur

1. Alarcón B, Mestre D, Martínez-Martín N. 2011. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology*. 133(4):420-5.
2. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. (2006). Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 126(1):32-41.
3. Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N, Rettig J. 2000. Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J*. 19(14):3586-96.
4. Augustin I, Betz A, Herrmann C, Jo T, Brose N. 1999. Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem. J*. 337(Pt 3):363–71.
5. Augustin I, Korte S, Rickmann M, Kretzschmar HA, Südhof TC, Herms JW, Brose N. 2001. The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J Neurosci*. 21(1):10-7.
6. Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N. 1999. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*. 400(6743):457-61.
7. Baetz K, Isaaz S, Griffiths GM. (1995). Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J Immunol*. 154(11):6122-31.
8. Beal AM, Anikeeva N, Varma R, Cameron TO, Norris PJ, Dustin ML, Sykulev Y. 2008. Protein kinase C theta regulates stability of the peripheral adhesion ring junction and contributes to the sensitivity of target cell lysis by CTL. *J Immunol*. 181(7):4815-24.

9. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK, Shanahan F. 1998. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol.* 160(11):5669-75.
10. Berke G. 1995. The CTL's kiss of death. *Cell.* 81(1):9-12.
11. Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin I, Neher E, Südhof TC, Rettig J, Brose N. 1998. Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron.* 21(1):123-36.
12. Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N. 1997. Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem.* 272(4):2520-6.
13. Biburger M, Nimmerjahn F. 2012. Low level of FcγRIII expression on murine natural killer cells. *Immunol Lett.* 143(1):53-9
14. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329(6139):512-8.
15. Blomberg K, Hautala R, Lövgren J, Mukkala VM, Lindqvist C, Akerman K. 1996. Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods.* 193(2):199-206.
16. Blott EJ, Griffiths GM. 2002. Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:122-131.
17. Bossi G, Griffiths GM. 1999. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat. Med.* 5:90-96.

18. Bossi G, Trambas C, Booth S, Clark R, Stinchcombe J, Griffiths GM. 2002. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev.* 189:152-60.
19. Bots M, Medema JP. 2006. Granzymes at a glance. *J Cell Sci.* 119(Pt 24):5011-4.
20. Boyman O, Sprent J. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2(3):180-90.
21. Bromley SK, Laboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, Weiss A, Dustin ML. 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol.* 2(12):1159-66.
22. Brose N, Hofmann K, Hata Y, Südhof TC. 1995. Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem.* 270(42):25273-80.
23. Brose N, Rosenmund C, Rettig J. 2000. Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:303-311.
24. Carlton PM. 2008. Three-dimensional structured illumination microscopy and its application to chromosome structure. *Chromosome Res.* 2008;16(3):351-65.
25. Chen YA, Scheller RH. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):98-106.
26. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24(18):3546-51.
27. Crabtree GR, Clipstone NA. 1994. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem.* 63:1045-83.

28. Crozat K, Hoebe K, Ugolini S, Hong NA, Janssen E, Rutschmann S, Mudd S, Sovath S, Vivier E, Beutler B. 2007. Jinx, an MCMV susceptibility phenotype caused by disruption of *Unc13d*: a mouse model of type 3 familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Exp Med*. 204(4):853-63.
29. Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kürzinger K, Springer TA. 1981. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78(7):4535-9.
30. Davis CW, Dickey BF. 2008. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu Rev Physiol*. 70:487-512.
31. de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A. 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*. 2010 Aug;10(8):568-79.
32. Dustin ML, Colman DR. 2002. Neural and immunological synaptic relations. *Science* 298(5594):785-9.
33. Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, Widder P, Rosenberger F, van der Merwe PA, Allen PM, Shaw AS. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*. 94(5):667-77.
34. Eisenbarth SC and Flavell RA. 2009. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. *EMBO Mol Med*. 1(2):92-8.
35. Elstak ED, Neeft M, Nehme NT, Voortman J, Cheung M, Goodarzifard M, Gerritsen HC, van Bergen En Henegouwen PM, Callebaut I, de Saint Basile G, van der Sluijs P. 2011. The *munc13-4-rab27* complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood*. 118(6):1570-8.

36. Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF. 2009. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Curr Opin Pulm Med.* 15(1):4-11.
37. Fasshauer D. (2003). Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1641(2-3):87–97.
38. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachée-Chardin M, Chedeville G, Tamary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G. 2003. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell.* 115(4):461-73.
39. Feske S, Giltneane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2(4):316-24. Erratum in: *Nat Immunol.* 2008 Mar;9(3):328-9.
40. Fowler KT, Andrews NW, Huleatt JW. (2007). Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol.* 178(3):1498-504.
41. Frauwirth KA. and Thompson CB. 2002. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest.* 109(3):295–299.
42. Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 5(7):532-45.
43. Friedman B, Frackelton AR Jr, Ross AH, Connors JM, Fujiki H, Sugimura T, Rosner MR. 1984. Tumor promoters block tyrosine-specific phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(10):3034-8.
44. Gauen LK, Zhu Y, Letourneur F, Hu Q, Bolen JB, Matis LA, Klausner RD, Shaw AS. 1994. Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif. *Mol Cell Biol.* 14(6):3729-41.

45. Geiger B, Rosen D, Berke G. 1982. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol.* 95(1):137-43.
46. Goldenberg NM, Silverman M. 2009. Rab34 and its effector munc13-2 constitute a new pathway modulating protein secretion in the cellular response to hyperglycemia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 297(4):C1053-8.
47. Goldschneider I, Komschlies KL, Greiner DL. 1986. Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med.* 163(1):1-17.
48. Goransdotter Ericson K, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S, Soderhall C, Samuelsson A, Janka G, Schneider M, Gurgey A, Yalman N, Revesz T. (2001). Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet.* 68(3):590-7.
49. Gowans JL, Knight EJ. (1964). The Route of Re-Circulation of Lymphocytes in the Rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 159:257-82.
50. Griffiths GM, Argon Y. 1995. Structure and biogenesis of lytic granules. *Curr Top Microbiol Immunol.* 198:39-58.
51. Gustafsson MG, Shao L, Carlton PM, Wang CJ, Golubovskaya IN, Cande WZ, Agard DA, Sedat JW. 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J.* 94(12):4957-70.
52. Henkart PA, Sitkovsky MV. 1994. Cytotoxic lymphocytes. Two ways to kill target cells. *Curr Biol.* 4(10):923-5.
53. Hepp R, Puri N, Hohenstein AC, Crawford GL, Whiteheart SW, Roche PA. 2005. Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells. *J. Biol. Chem.* 280(8):6610-20.

54. Higashio H, Nishimura N, Ishizaki H, Miyoshi J, Orita S, Sakane A, Sasaki T. 2008. Doc2 alpha and Munc13-4 regulate Ca(2+) -dependent secretory lysosome exocytosis in mast cells. *J Immunol.* 180(7):4774-84.
55. Hong W. 2005. Cytotoxic T lymphocyte exocytosis: bring on the SNAREs! *Trends Cell Biol.* 5(12):644-50.
56. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS. 1997. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol.* 137(3):633-48.
57. Houston EG Jr, Boursalian TE, Fink PJ. 2012. Homeostatic signals do not drive post-thymic T cell maturation. *Cell Immunol.* [Epub ahead of print]
58. Huppa JB, Davis MM. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 3(12):973-83.
59. Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631–643.
60. Janka GE. 2012. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu Rev Med.* 63:233-46.
61. Jenkins MR, Griffiths GM. 2010. The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Curr Opin Immunol.* 22(3):308-13.
62. Johnson JL, Hong H, Monfregola J, Catz SD. 2011. Increased survival and reduced neutrophil infiltration of the liver in Rab27a- but not Munc13-4-deficient mice in lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. *Infect Immun.* 79(9):3607-18.
63. Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neefjes J. 2005. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic.* 6(12):1070-7.

64. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol.* 14:207-32.
65. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 265(5171):528-30.
66. Kajino K, Kajino Y, Greene MI. 1998. Fas- and perforin-independent mechanism of cytotoxic T lymphocyte. *Immunol Res.* 17(1-2):89-93.
67. Kang L, He Z, Xu P, Fan J, Betz A, Brose N, Xu T. 2006. Munc13-1 is required for the sustained release of insulin from pancreatic beta cells. *Cell Metab.* 3(6):463-8.
68. King AC, Cuatrecasas P. 1982. Resolution of high and low affinity epidermal growth factor receptors. Inhibition of high affinity component by low temperature, cycloheximide, and phorbol esters. *J Biol Chem.* 257(6):3053-60.
69. Koch H, Hofmann K, Brose N. 2000. Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochem J.* 349(Pt 1):247-53.
70. Kojima H, Shinohara N, Hanaoka S, Someya-Shirota Y, Takagaki Y, Ohno H, Saito T, Katayama T, Yagita H, Okumura K. (1994). Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 1(5):357-64.
71. Kolset SO, Tveit H. 2008. Serglycin--structure and biology. *Cell Mol Life Sci.* 65(7-8):1073-85.
72. Kuhn JR, Poenie M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity.* 16(1):111-21.

73. Kuiper HM, de Jong R, Brouwer M, Lammers K, Wijdenes J, van Lier RA. 1994. Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunology*. 83(1):38-44.
74. Kupfer A, Dennert G. 1984. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol*. 133(5):2762-6.
75. Kurowska M, Goudin N, Nehme NT, Court M, Garin J, Fischer A, de Saint Basile G, Ménasché G. 2012. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood*. [Epub ahead of print]
76. Kwan EP, Xie L, Sheu L, Nolan CJ, Prentki M, Betz A, Brose N, Gaisano HY. 2006. Munc13-1 deficiency reduces insulin secretion and causes abnormal glucose tolerance. *Diabetes*. 55(5):1421-9.
77. Lebedeva T, Anikeeva N, Kalams SA, Walker BD, Gaidarov I, Keen JH, Sykulev Y. 2004. Major histocompatibility complex class I-intercellular adhesion molecule-1 association on the surface of target cells: implications for antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*. 113(4):460-71.
78. Lee KH, Dinner AR, Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, Sims TN, Burack WR, Wu H, Wang J, Kanagawa O, Markiewicz M, Allen PM, Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS. 2003. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*. 302(5648):1218-22.
79. Lehmann-Grube F, Assmann U, Loliger C, Moskophidis D, Lohler J. Mechanism of recovery from acute virus infection. I. 1985. Role of T lymphocytes in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from spleens of mice. *J Immunol*. 134(1):608-615.
80. Lewis RS. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 19:497-521.

81. Lieberman J. 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 3(5):361-70.
82. Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. (2003). Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol.* 111(5):923-32; quiz 933.
83. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature.* 370(6491):650-2.
84. Lowin B, Peitsch MC, Tschopp J. (1995). Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Curr Top Microbial Immunol.* 198:1-24.
85. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(8):622-32.
86. Lynch CJ, Charest R, Bocckino SB, Exton JH, Blackmore PF. 1985. Inhibition of hepatic alpha 1-adrenergic effects and binding by phorbol myristate acetate. *J Biol Chem.* 260(5):2844-51.
87. Lyubchenko TA, Wurth GA, Zweifach A. (2001). Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity.* 15(5):847-59.
88. Marcenaro S, Gallo F, Martini S, Santoro A, Griffiths GM, Aricó M, Moretta L, Pende D. 2006. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood.* 108(7):2316-23.

89. Matsumoto T, Molski TF, Volpi M, Pelz C, Kanaho Y, Becker EL, Feinstein MB, Naccache PH, Sha'afi RI. 1986. Treatment of rabbit neutrophils with phorbol esters results in increased ADP-ribosylation catalyzed by pertussis toxin and inhibition of the GTPase stimulated by fMet-Leu-Phe. *FEBS Lett.* 198(2):295-300.
90. McNally BA, Somasundaram A, Yamashita M, Prakriya M. 2012. Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature.* 482(7384):241-5.
91. Mempel TR, Scimone ML, Mora JR, von Andrian UH. 2004. In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol.* 16(4):406-17.
92. Menasche G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, Wulffraat N, Bianchi D, Fischer A, Le Deist F. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet.* 25(2):173-6.
93. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 395(6697):82-6.
94. Mori R, Ikematsu K, Kitaguchi T, Kim SE, Okamoto M, Chiba T, Miyawaki A, Shimokawa I, Tsuboi T. 2011. Release of TNF- α from macrophages is mediated by small GTPase Rab37. *Eur J Immunol.* 41(11):3230-9.
95. Nagy G, Kim JH, Pang ZP, Matti U, Rettig J, Südhof TC, Sørensen JB. 2006. Different effects on fast exocytosis induced by synaptotagmin 1 and 2 isoforms and abundance but not by phosphorylation. *J Neurosci.* 26(2):632-43.
96. Neeft M, Wieffer M, de Jong AS, Negroiu G, Metz CH, van Loon A, Griffith J, Krijgsveld J, Wulffraat N, Koch H, Heck AJ, Brose N, Kleijmeer M, van der Sluijs P. 2005. Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol Biol Cell.* 16(2):731-41.

97. Norcross MA. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 135D(2):113-134.
98. Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U, Rettig J. 2007. Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci.* 27(6):1386-95.
99. O'Flaherty JT, Jacobson D, Redman J. 1988. Mechanism involved in the mobilization of neutrophil calcium by 5-hydroxyeicosatetraenoate. *J Immunol.* 140(12):4323-8.
100. O'Flaherty JT, Jacobson DP, Redman JF. 1989. Bidirectional effects of protein kinase C activators. Studies with human neutrophils and platelet-activating factor. *J Biol Chem.* 264(12):6836-43.
101. Pachlopnik Schmid J, de Saint Basile G. 2010. Angeborene hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH). *Klin Padiatr.* 22(6):345-50.
102. Pattu V, Qu B, Schwarz EC, Strauss B, Weins L, Bhat SS, Halimani M, Marshall M, Rettig J, Hoth M. 2012. SNARE protein expression and localization in human cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2012 Feb;42(2):470-5.
103. Paul WE, Brown M, Hornbeck P, Mizuguchi J, Ohara J, Rabin E, Snapper C, Tsang W. (1987). Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 505, 82-89.
104. Pivot-Pajot C, Varoqueaux F, de Saint Basile G, Bourgoin SG. 2008. Munc13-4 regulates granule secretion in human neutrophils. *J Immunol.* 180(10):6786-97.
105. Podack ER, Lowrey DM, Lichtenheld M, Olsen KJ, Aebischer T, Binder D, Rupp F, Hengartner H. 1988. Structure, function and expression of murine and human perforin 1 (P1). *Immunol Rev.* 103:203-11.

106. Pombo I, Martin-Verdeaux S, Iannascoli B, Le Mao J, Deriano L, Rivera J, Blank U. 2001. IgE receptor type I-dependent regulation of a Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes. *J. Biol. Chem.* 276(46):42893-900.
107. Potter TA, Grebe K, Freiberg B, Kupfer A. 2001. Formation of supramolecular activation clusters on fresh ex vivo CD8⁺ T cells after engagement of the T cell antigen receptor and CD8 by antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(22):12624-9.
108. Prakriya M. 2009. The molecular physiology of CRAC channels. *Immunol Rev.* 2009 Sep;231(1):88-98.
109. Richmond JE, Weimer RM, Jorgensen EM. 2001. An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature.* 412(6844):338-341.
110. Risma K, Jordan MB. 2011. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: updates and evolving concepts. *Curr Opin Pediatr.* 24(1):9-15.
111. Rizo J, Rosenmund C. 2008. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15(7):665-674.
112. Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N, Rhee JS. 2002. Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron.* 33(3):411-24.
113. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18(21):6409-12.
114. Samelson LE. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol.* 20:371-94.

115. Sanchez-Ruiz Y, Valitutti S, Dupre L. 2011. Stepwise maturation of lytic granules during differentiation and activation of human CD8+ T lymphocytes. *PLoS One*. 6(11):e27057.
116. Schermelleh L, Carlton PM, Haase S, Shao L, Winoto L, Kner P, Burke B, Cardoso MC, Agard DA, Gustafsson MG, Leonhardt H, Sedat JW. 2008. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*. 2008 Jun 6;320(5881):1332-6.
117. Schmitz F, Augustin I, Brose N. 2001. The synaptic vesicle priming protein Munc13-1 is absent from tonically active ribbon synapses of the rat retina. *Brain Res*. 895(1-2):258-63.
118. Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, Amigorena S. 2008. Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity*. 28(2):258-70.
119. Shakhar G, Lindquist RL, Skokos D, Dudziak D, Huang JH, Nussenzweig MC, Dustin ML. 2005. Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol*. 6(7):707-14.
120. Sheu L, Pasyk EA, Ji J, Huang X, Gao X, Varoquaux F, Brose N, Gaisano HY. 2003. Regulation of insulin exocytosis by Munc13-1. *J Biol Chem*. 278(30):27556-63.
121. Song Y, Ailenberg M, Silverman M. 1998. Cloning of a novel gene in the human kidney homologous to rat munc13s: its potential role in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 53(6):1689-95.
122. Stevens DR, Wu ZX, Matti U, Junge HJ, Schirra C, Becherer U, Wojcik SM, Brose N, Rettig J. 2005. Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1. *Curr Biol*. 15(24):2243-8.

123. Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, Seabra MC, Griffiths GM. 2001. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol.* 152(4):825-34.
124. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity.* 15(5):751-61.
125. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature.* 43(7110):462-5.
126. Stow JL, Manderson AP, Murray RZ. (2006). SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 6(12):919-929.
127. Stradal TE, Rottner K, Dianza A, Confalonieri S, Innocenti M, Scita G. (2004). Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14(6):303-311.
128. Straus DB, Weiss A. 1992. Genetic evidence for the involvement of the *lck* tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell.* 70(4):585-93.
129. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75(6):1169–1178.
130. Südhof TC, Rothman JE. 2009. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474–477
131. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell.* 76(6):969-76.

132. Thome M, Tschopp J. 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol.* 1(1):50-8.
133. Trapani JA. 2012. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ.* 19(1):21-7
134. Trickett A, Kwan YL. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods.* 275(1-2):251-5.
135. van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 184(5):1781-90.
136. van der Sluijs P, Neeft M, van Vlijmen T, Elstak E, Wieffer M. 2008. Methods for analysis of rab27a/Munc13-4 in secretory lysosome release in hematopoietic cells. *Methods Enzymol.* 438:185-201.
137. Varoqueaux F, Sigler A, Rhee JS, Brose N, Enk C, Reim K, Rosenmund C. 2002. Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(13):9037-42.
138. Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science.* 283(5402):680-2.
139. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 331(6013):44-9.
140. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. 2010. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev.* 235(1):35-54.

141. Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R, Clark WR. 1994. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(23):10854-8.
142. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 356(6367):314-7.
143. Weitzman S. 2011. Approach to hemophagocytic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011:178-83.
144. Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M, Valitutti S. 2008. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(29):10985-90.
145. Yamada-Ohnishi Y, Azuma H, Urushibara N, Yamaguchi M, Fujihara M, Kobata T, Ikeda H. 2004. Cytotoxic difference of T cells expanded with anti-CD3 monoclonal antibody in the presence and absence of anti-CD 28 monoclonal antibody. *Stem Cells Dev.* 13(3):315-22.
146. Yannelli JR, Sullivan JA, Mandell GL, Engelhard VH. 1986. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *J Immunol.* 136(2):377-82.
147. Zhang E, Xue R, Soo J, Chen P. 2008. Effects of phorbol ester on vesicle dynamics as revealed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Pflugers Arch.* 457(1):211-22.
148. Zhou F. 2010. Perforin: more than just a pore-forming protein. *Int Rev Immunol.* 29(1):56-76.
149. Zinkernagel RM, Doherty PC. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 19;248(450):701-2.

150. Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, Schneppenheim R, Kabisch H, Janka G, Hennies HC. 2006. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat.* 27(1):62-8.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jens Rettig danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn PD Dr. Elmar Krause danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und für das zeitaufwändige Korrekturlesen.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Rettig für die Hilfsbereitschaft die mir zuteil wurde und für die kritischen Diskussionen und Anregungen für meine Arbeit.

Ein Besonderer Dank gilt Dr. David Stevens für die Beantwortung meiner Fragen und die immer andauernde Diskussionsbereitschaft, Dr. Claudia Schirra für die Übernahme der EM-Experimente, Dr. Ulf Matti für die Hilfestellung meiner molekularbiologischen Problemen und Dr. Monika Maier-Peuschel fürs Korrekturlesen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Reiko Trautmann, Carolin Bick, Manuela Schneider, Katrin Sandmeier, Anja Ludes, Anne Weinland und Frau Schwarz für die Erledigungen organisatorische Angelegenheiten im Labor als auch für den Verwaltungsakt.

Nicht vergessen möchte ich die T-Zell-Gruppe. Vielen Dank für die sehr interessante und lehrreiche Zeit.

Danken möchte ich auch den Kooperationsarbeitsgruppen von Prof. Dr. Oliver Planz und Prof. Dr. Martina Sester.

Zum Schluß danke ich ganz besonders meinen Eltern ohne deren Hilfe und Unterstützung ich nicht so weit gekommen wäre.

Aber ein ganz ganz besonderer Dank gilt Jochen. Danke, dass du immer für mich da bist!!!!!!

11. Publikationen

Literatur

Sternfeld L, Dudenhöffer M, Ludes A, Heinze D, Anderie I, Krause E. 2007. Activation of muscarinic receptors reduces store-operated Ca²⁺ entry in HEK293 cells. *Cell Signal*. 19(7):1457-64.

Dudenhöffer-Pfeifer M, Schirra C, Stevens D, Dirks J, Sester M, Planz O, Marshall M, Halimani M, Jung M, Lipp P, Hoth M, Krause E, Rettig J. Different Munc13 isoforms function in lytic granule release from cytotoxic T lymphocytes. in preparation

Dudenhöffer-Pfeifer M, Planz O, Krause E, Rettig J. Quantitative distribution of Fas/FasL-pathway and lytic granule-mediated pathway in cytotoxic T lymphocytes. in preparation

Posterbeiträge

Two different pathways contribute to cytotoxicity of mouse cytotoxic T lymphocytes. 90. Annual Meeting of the German Physiological Society in Regensburg 2011

Two different pathways contribute to cytotoxicity of mouse cytotoxic T lymphocytes. 98. Annual Meeting of The American Association of Immunologists in San Francisco 2011

12. Lebenslauf

MONIKA DUDENHÖFFER-PFEIFER

AUSBILDUNG

August 1984 – Juli 1988 Grundschule Husterhöh	Pirmasens
August 1988 – Juni 1989 Leibniz Gymnasium	Pirmasens
Juli 1989 – Juni 1994 Staatliche Realschule	Pirmasens
August 1994 – Juni 1997 Wirtschaftsgymnasium	Pirmasens
Oktober 1997 – September 2000 Ausbildung zur Kinderkrankenschwester am Universitätsklinikum	Bonn
Oktober 2000 – Oktober 2005 Hochschulstudium im Fach Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlands	Saarbrücken
März 2006 – November 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Emmy Noether Arbeitsgruppe von Dr. med. Christoph Maack, Innere Medizin III, Universitätskliniken des Saarlands	Homburg
Dezember 2007 – heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Jens Rettig, Physiologie, Universität des Saarlands	Homburg

PRAKTIKUM UND AUSLANDSAUFENTHALT

April 2003 – Mai 2003 • Praktikum am Institut für Humangenetik	Universität des Saarlands
Dezember 2003 – Januar 2004 • Fortgeschrittenes Praktikum am Physiologischen Institut	Universität des Saarlands
Februar 2005 – Oktober 2005 • Diplomarbeit am Physiologischen Institut	Universität des Saarlands
November 2006 – Februar 2006 • Praktikum an der School of Molecular and Microbial Biosciences	University of Sydney

SONSTIGE VERANSTALTUNGEN UND NEBENTÄTIGKEITEN

2003 - 2005 Universitätsklinik des Saarlands
Nebentätigkeit als Sitzwache kardiologische
Station.

Sommersemester 2005 Universität des Saarlands
Betreuung des physiologischen Praktikums im Bereich
Herz und Kreislauf.

2007 – 2009 Universitätsklinik des Saarlands
Nebentätigkeit als Krankenschwester kardiologische
Überwachungsstation.

SONSTIGE KENNTNISSE

Sicherer Umgang in den Betriebssystemen
Windows und Mac OS X.

Gute Kenntnisse im Umgang mit MS Office
Produkten für PC und Mac.

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (Wort und Schrift)

Französisch Grundkenntnisse

INTERESSEN

Sport/Fitness
Lesen
Digitalfotografie
Reisen

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, April 2012