

# **Universität Ulm**

Institut für Physiologische Chemie

Direktor: Prof. Dr. Thomas Wirth

---

## **Die Rolle der Bruton-Tyrosinkinase in murinen myeloiden dendritischen Zellen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

**Lena Maria Siebert**

geboren in Erlangen

**2013**

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. Cornelia Brunner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Bullinger

Tag der Promotion: 13.12.2013

Ein Mensch sieht sich auf dieser Welt  
Vor mehr als ein Problem gestellt.  
Wie weit wir Gescheiten´s auch trieben –  
Die Grenzen sind doch uns geblieben:  
Denn Gott kann sie heiter  
Ins Ewige weiter,  
Ins Unerforschliche, schieben.

**Eugen Roth**, Ignorabimus

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das menschliche Immunsystem.....	1
1.1.1 Die angeborene Immunabwehr .....	1
1.1.2 Die erworbene Immunabwehr.....	2
1.2 Die dendritischen Zellen.....	3
1.2.1 Ontogenese dendritischer Zellen.....	3
1.2.2 Funktionen dendritischer Zellen.....	4
1.3 Toll-like Rezeptoren.....	6
1.3.1 TLR und ihre Liganden .....	6
1.3.2 Signaltransduktion der TLR .....	9
1.4 Die Bruton-Tyrosinkinase .....	12
1.4.1 Proteinstruktur der Btk .....	12
1.4.2 Die Btk im BCR Signalweg .....	14
1.4.3 Die Btk im TLR Signalweg .....	17
1.4.4 Mutationen im Btk Gen – XLA und Xid .....	18
1.4.5 Die Bedeutung der Btk für myeloide Zellen .....	20
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	23
2.1.3 Medien für die Zellkultur.....	24
2.1.4 Mauslinien .....	24
2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	25
2.1.6 Weitere Antikörper .....	25
2.1.7 Liganden der TLR .....	25
2.1.8 Gebrauchsfertige Kits .....	25
2.1.9 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.10 Geräte .....	27
2.1.11 Datenverarbeitung .....	27
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Zählen von Zellen .....	28
2.2.2 Zentrifugation von Zellen .....	28
2.2.3 Kultivierung dendritischer Zellen im Brutschrank.....	28

---

2.2.4	Präparation von Mäusen.....	28
2.2.5	Generierung dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks .....	30
2.2.6	Gewinnung von T-Zellen aus Lymphknoten und Milz.....	31
2.2.7	Stimulation dendritischer Zellen mit TLR-Liganden .....	32
2.2.8	Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern.....	33
2.2.9	Durchführung des Migrationsversuchs .....	36
2.2.10	Durchführung der Kokultivierung dendritischer Zellen mit T-Zellen.....	40
2.2.11	Statistik.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1	Die Entwicklung dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen .....	44
3.2	Analyse von charakteristischen Oberflächenmarkern dendritischer Zellen .....	48
3.2.1	Expression von MHC-II .....	49
3.2.2	Expression von CD11a .....	51
3.2.3	Expression von CD11b und CD11c .....	52
3.2.4	Expression von CD18 .....	53
3.2.5	Expression von CD43 .....	55
3.2.6	Expression von CD44 .....	57
3.2.7	Expression von CD54 (ICAM-1).....	59
3.2.8	Expression von CD184 (CXCR4).....	61
3.2.9	Expression von CD197 (CCR7) .....	63
3.3	Analyse des Migrationsverhaltens.....	65
3.4	Analyse der Kokultivierung dendritischer Zellen mit T-Zellen .....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
4.1	Der Einfluss der Btk auf die Entwicklung dendritischer Zellen.....	73
4.2	Die Bedeutung der Btk für die Chemotaxis dendritischer Zellen .....	76
4.3	Die Rolle der Btk in der Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen.....	81
4.4	Die Beteiligung der Btk an der Signalweiterleitung der Toll-like Rezeptoren.....	84
4.5	Der Stellenwert dendritischer Zellen für die Agammaglobulinämie .....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>
5.1	Zusammenfassung (deutsch).....	89
5.2	Summary (english) .....	91
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>109</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>111</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>112</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

### A. Allgemeine Abkürzungen

<b><math>\alpha</math></b>	<i>anti</i> , Zeichen für einen Antikörper
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AP-1</b>	Aktivator Protein 1
<b>APC</b>	Allophycocyanin, Fluoreszenzfarbstoff für die Durchflusszytometrie
<b>APC</b>	Antigen-präsentierende Zellen ( <i>antigen-presenting cells</i> )
<b>BCR</b>	B-Zell Rezeptor ( <i>B-cell receptor</i> )
<b>BLNK</b>	Protein des BCR Signalwegs ( <i>B-cell linker protein</i> )
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>BTK</b>	Bruton-Tyrosinkinase
<b>CCL</b>	Liganden mit CC-Motiv (Chemokine), besitzen zwei benachbarte Cysteine
<b>CCR</b>	Rezeptor für Liganden mit CC-Motiv
<b>CD</b>	Immunphänotypische Oberflächenmerkmale auf Zellen ( <i>cluster of differentiation</i> )
<b>CLP</b>	Stammzelle der lymphoiden Zellreihe ( <i>common lymphoid progenitor</i> )
<b>CMP</b>	Stammzelle der myeloiden Zellreihe ( <i>common myeloid progenitor</i> )
<b>CXCL</b>	Liganden mit CXC-Motiv (Chemokine), besitzen zwei Cysteine, getrennt durch eine weitere Aminosäure
<b>CXCR</b>	Rezeptor für Liganden mit CXC-Motiv
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DAMP</b>	Molekulare Erkennungsmuster der Zellschädigung ( <i>damage-associated molecular patterns</i> )
<b>DC</b>	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat, Komplexbildner
<b>FACS</b>	Durchflusszytometer ( <i>fluorescence activated cell scanner</i> )
<b>FCS</b>	Fetales Kalbserum ( <i>fetal calf serum</i> )

---

<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff für die Durchflusszytometrie
<b>FLT3</b>	Rezeptor der Zelldifferenzierung ( <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i> )
<b>FSC</b>	Vorwärtsstreuung des Laserlichtes in der Durchflusszytometrie ( <i>forward scatter</i> )
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen Wachstumsfaktor ( <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> )
<b>GM-CSFR<math>\alpha</math></b>	$\alpha$ -Kette des GM-CSF Rezeptors
<b>GMP</b>	Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle ( <i>Granulocyte-monocyte progenitor</i> )
<b>HGF</b>	Faktor des zellulären Wachstums und Motilität ( <i>hepatic growth factor</i> )
<b>HIMF</b>	Chemotaktisch wirkendes Molekül ( <i>hypoxia induced mitogenic factor</i> )
<b>ICAM</b>	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül ( <i>intracellular adhesion molecule</i> )
<b>Ig</b>	Immunglobulin(e)
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IRAK</b>	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
<b>IRF</b>	Interferon-Regulator Faktor, Transkriptionsfaktor
<b>ITAM</b>	Teil des BCR ( <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i> )
<b>IP3</b>	Inositoltrisphosphat
<b>KO</b>	<i>Knock-Out</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid, Ligand des TLR4
<b>LRR</b>	extrazelluläre Domäne der TLR ( <i>leucin-rich repeats</i> )
<b>M.</b>	Morbus
<b>MACS</b>	Verfahren der magnetischen Isolation von Zellen ( <i>magnetic cell separation</i> )
<b>MAL</b>	Adapterprotein im TLR Signalweg ( <i>MyD88-adaptor-like protein</i> )
<b>MEP</b>	Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle ( <i>megakaryocyte-erythrocyte progenitor</i> )
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>MIP-3 <math>\beta</math></b>	Chemokin (Synonym CCL19), Ligand des CD197 (CCR7) ( <i>mouse macrophage inflammatory protein-3 beta</i> )
<b>MyD88</b>	Adapterprotein im TLR Signalweg ( <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i> )

---

<b>NF-AT</b>	Transkriptionsfaktor ( <i>nuclear factor of activated T cells</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Transkriptionsfaktor ( <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>NOD</b>	Motiv einer Rezeptorengruppe ( <i>Nucleotide-binding oligomerization domain protein</i> )
<b>ODN</b>	CpG-Oligodesoxynucleotid, Ligand des TLR9
<b>PAMP</b>	Molekulares Erkennungsmuster von Pathogenen ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
<b>PB</b>	Fluoreszenzfarbstoff für die Durchflusszytometrie ( <i>pacific blue</i> )
<b>PBS</b>	Pufferlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PE</b>	Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff für die Durchflusszytometrie
<b>PIP2</b>	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
<b>PIP5K</b>	Phosphatidylinositol4-phosphat-5-kinase
<b>PLC<math>\gamma</math>2</b>	Phospholipase C $\gamma$ 2
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>Poly I:C</b>	Synthetisches dsRNA Analogon, Ligand des TLR3 ( <i>polyinosine-polycytidylic acid</i> )
<b>PRR</b>	Pathogene Muster erkennende Rezeptoren ( <i>pattern recognition receptors</i> )
<b>RIP</b>	Rezeptor-interagierende Proteine, Teil der MyD88-unabhängigen TLR Signalwege
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleinacid</i> )
<b>RPMI</b>	Grundmedium für die Zellkultivierung ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
<b>SARM</b>	Adapterprotein im TLR Signalweg ( <i>Steril <math>\alpha</math>- and Armadillo-motif-containing protein</i> )
<b>SDF-1 <math>\alpha</math></b>	Chemokin (Synonym CXCL12), Ligand des CD184 (CXCR4) ( <i>stromal cell-derived factor-1 alpha</i> )
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i>
<b>SSC</b>	Seitwärtsstreuung des Laserlichtes in der Durchflusszytometrie ( <i>side scatter</i> )
<b>Syk</b>	Tyrosinkinase im BCR Signalweg ( <i>spleen tyrosine kinase</i> )
<b>TC</b>	T-Lymphozyt/T-Zelle ( <i>T cell</i> )



<b>TIR</b>	Domäne in TLR und IL1-Rezeptoren
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha, Zytokin des Immunsystems
<b>TRAM</b>	Adapterprotein im TLR Signalweg ( <i>TRIF-related adaptor molecule</i> )
<b>TRIF</b>	Adapterprotein im TLR Signalweg ( <i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-<math>\beta</math></i> )
<b>WASP</b>	An der zytoskelettalen Struktur beteiligtes Protein ( <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i> )
<b>Xid</b>	Murine Form der XLA ( <i>X-linked immunodeficiency</i> )
<b>XLA</b>	Agammaglobulinämie, M. Bruton ( <i>X-linked agammaglobulinemia</i> )

## B. Abkürzungen physikalischer Einheiten

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Ci</b>	Curie
<b>cpm</b>	Einheit ionisierender Strahlung ( <i>counts per minute</i> )
<b>Da</b>	Dalton
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunden
<b>kb</b>	Kilobasen (Längeneinheit für Nucleinsäuren)
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	Molar (mol pro Liter)
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogramm
<b>min</b>	Minuten
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b><math>\mu</math>m</b>	Mikrometer
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
<b>s</b>	Sekunden

# 1 Einleitung

## 1.1 Das menschliche Immunsystem

Der menschliche Organismus muss sich mit einer Vielzahl von unterschiedlichen (Mikro-) Organismen in seiner Umwelt auseinandersetzen. Diese können für ihn nützlich und notwendig sein, sie sind aber auch in der Lage, den Körper zu bedrohen oder zu schädigen. Um die Integrität des menschlichen Körpers zu erhalten und ihn vor krankheitserregenden Organismen zu schützen, verfügt der Mensch über das Immunsystem - ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Organen, Zellen und Molekülen. Das Immunsystem besteht aus zwei eng miteinander korrelierenden Teilen - die angeborene und die erworbene Immunabwehr.

### 1.1.1 Die angeborene Immunabwehr

Der angeborene Teil des Immunsystems entwickelte sich sehr früh in der Phylogenese. Er bildet eine unspezifische erste Barriere gegen schädliche Organismen und funktioniert von Geburt an. Zu diesem Teil gehören mechanische und chemische Abwehrmechanismen des Körpers, wie zum Beispiel das Epithel von Haut und Schleimhäuten, das saure Milieu des Magens oder die lysozymhaltige Tränenflüssigkeit. Kann ein Mikroorganismus diese ersten Barrieremechanismen aber überwinden, dann sind die Zellen der angeborenen Immunität in der Lage, diesen durch keimbahncodierte Rezeptoren zu erkennen und zu bekämpfen. Zu diesen Pathogen-erkennenden Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) zählen die sog. Toll-like Rezeptoren (TLR). Durch sie können die Immunzellen bestimmte, unveränderliche molekulare Muster, die sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), auf den Pathogenen erkennen und eine an den Erreger angepasste Immunantwort einleiten. Die angeborene Immunität verfügt damit auch über eine gewisse Spezifität.

Interessant ist dabei, dass die TLR nicht nur pathogene und körperfremde Signale erkennen können, sondern ebenso körpereigene Signale, die auf eine Zell- oder Gewebsschädigung hinweisen. Neben ihrer Bedeutung für die erste

Bekämpfung von Pathogenen sind die Zellen der angeborenen Immunabwehr damit auch stark beteiligt an physiologischen Prozessen, wie der Reparatur von geschädigtem Gewebe [130] oder der Beseitigung apoptotischer Zellen [11]. Zu den Zellen der angeborenen Immunabwehr zählen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen, sowie die dendritischen Zellen (DC).

### **1.1.2 Die erworbene Immunabwehr**

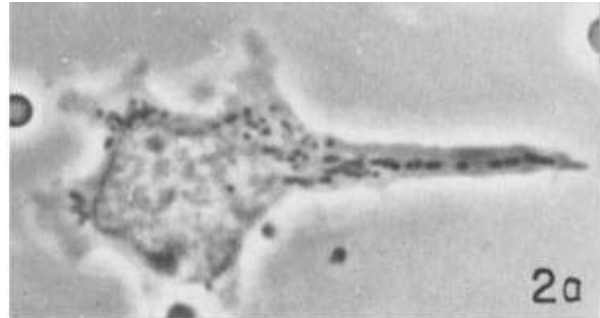
Die höher entwickelten Wirbeltiere besitzen neben der angeborenen Immunität noch einen erworbenen Teil - die adaptive Immunabwehr.

Dieser Teil des Immunsystems zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und eine enorme Anpassungsfähigkeit gegenüber veränderten oder neuen Krankheitserregern aus. Ist ein pathogener Keim trotz der unspezifischen Abwehr in den Körper eingedrungen, so wird er von den Zellen der angeborenen Immunabwehr erfasst und den Zellen der erworbenen Immunabwehr - den Lymphozyten - präsentiert. Dies ist Aufgabe der antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC). Sie erkennen fremde Organismen, beispielsweise über die oben erwähnten PRR, phagozytieren diese und präsentieren dann bestimmte Teile (Peptide) des Pathogens - die Antigene - mithilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) auf ihrer Oberfläche. Erkannt werden die Antigene dann von Lymphozyten, d.h. von B-Zellen und T-Zellen (TC). Diese Immunzellen besitzen klonal exprimierte, hochspezifische Rezeptoren, mit denen sie die präsentierten, antigenen Determinanten auf den APC erkennen und gezielte Abwehrmechanismen einleiten. In erster Linie beinhaltet dies die Bildung von spezifischen Antikörpern.

## 1.2 Die dendritischen Zellen

Die erstmals 1973 beschriebenen DC [114] sind die wichtigsten Vertreter der APC des angeborenen Immunsystems. Sie fungieren als wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr. Namensgebend ist die charakteristische Morphologie unreifer DC mit bäumchenartigen Fortsätzen, ähnlich den Axondendriten der Neuronen (siehe Abb.1).

Die Hauptfunktionen der DC in der Immunabwehr beinhalten die Antigenaufnahme, die Antigenprozessierung und die Stimulation von TC. Unter den APC kommt den DC eine Schlüsselrolle zu, sie exprimieren auf ihrer Oberfläche in hoher Dichte MHC-



**Abb. 1: Dendritische Zelle**

Eines der ersten lichtmikroskopischen Bilder einer dendritischen Zelle und ihrer charakteristischen Axondendriten (aus [114]).

Moleküle der Klassen I und II (MHC-I bzw. MHC-II), wodurch die prozessierten Antigene den Lymphozyten präsentiert werden können [113].

### 1.2.1 Ontogenese dendritischer Zellen

Die DC gehören zur Gruppe der Leukozyten. Wie alle Zellen des Blutes, entwickeln sich die Leukozyten aus den pluripotenten, hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks. Man unterscheidet verschiedene Subtypen der DC, die auf unterschiedlichen Differenzierungswegen aus einer gemeinsamen CD34-positiven Vorläuferzelle hervorgehen [79].

Die Lebensdauer der DC beträgt etwa 10-14 Tage - Stunde um Stunde bilden sich etwa 4.300 neue Zellen aus den Vorläuferzellen [62]. Unterschiedliche Stimuli beeinflussen dabei die Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu verschiedenen Subtypen der DC, d.h. zu lymphoiden oder zu myeloiden Formen. Unter Kulturbedingung entwickeln sich nach Zugabe von CD154 (Synonym CD40L) und Interleukin 3 (IL-3) vorrangig lymphoide DC. Der lymphoide Subtyp ist hauptsächlich beteiligt an der Aktivierung von T-Helferzellen Typ 2 und regulatorischen TC [65].

Andere Stimuli, wie der Granulozyten-Makrophagenkolonie stimulierende Faktor (GM-CSF), IL-4 oder der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) führen dazu, dass sich primär myeloide DC aus den Vorläuferzellen entwickeln [32, 44, 95]. Dieser Subtyp bildet die Mehrzahl der DC im menschlichen Körper [113], er sezerniert in großer Menge IL-12 und führt zu Aktivierung von T-Helferzellen Typ 1, sowie zytotoxischen TC [65]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser myeloide Subtyp der DC durch Gabe von GM-CSF kultiviert und untersucht.

### 1.2.2 Funktionen dendritischer Zellen

Aus den Zellvorläufern entwickeln sich zunächst unreife Formen der DC, die sich hämatogen aus dem Knochenmark in die Oberflächengewebe des Körpers verteilen. Sie strecken dort ihre bäumchenartigen Fortsätze durch die Zellbarrieren, die *tight junctions*, der Epithelzellen an die Oberfläche [94]. Auf diese Weise können die DC die Oberflächenbarrieren des Körpers ständig auf Krankheitserreger kontrollieren. Treffen sie so auf körpereigene oder körperfremde Antigene, werden diese von ihnen phagozytiert und prozessiert. Daraufhin erfolgt eine - vorrangig lymphogene - Migration in die sekundär lymphatischen Organe des Körpers und die Ausreifung der Zellen [93]. Während der Ausreifung verlieren die DC ihre Fähigkeit zu Endozytose und Prozessierung von Antigenen und zeigen eine verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-II Molekülen, die bereits phagozytierte und zu Peptiden prozessierte Antigene präsentieren [74].

Gesteuert wird die Migration chemotaktisch durch verschiedene regulative Signalproteine [15, 90]. Dazu gehören unter anderem die Chemokine MIP-3  $\beta$  (Synonym CCL19) und SDF-1  $\alpha$  (Synonym CXCL12). Die beiden Rezeptoren für diese Chemokine - CD197 (Synonym CCR7) für MIP-3  $\beta$  und CD184 (Synonym CXCR4) für SDF-1  $\alpha$  - werden während des Reifungsprozesses verstärkt auf der Oberfläche der DC exprimiert [124] und sind essentiell für die Migration der DC aus der Peripherie in die lymphatischen Organe [28, 48, 83, 103]. MIP-3  $\beta$  wird von lymphatischen Geweben mit hoher Lymphozytendichte gebildet. Auf diese Weise können ausgereifte DC, die nur im reifen Stadium CD197 (CCR7) exprimieren, gezielt und effizient aus den peripheren Geweben in die

lymphatischen Gewebe rekrutiert werden [20]. Weitere Moleküle, welche die Reifung und Migration der DC steuern, sind das Oberflächenmolekül CD43 (Leukosialin/Sialophorin) [14], das durch Signale von Galectin-1 aktiviert wird [29], sowie der Komplex aus CD11a und CD18 (LFA-1), der den DC die Adhäsion an und die Transmigration durch lymphatische Endothelzellen ermöglicht [98, 104].

In den Lymphknoten präsentieren DC ihre aufgenommenen Antigene mithilfe der MHC-Moleküle den TC und anderen Lymphozyten [4]. Dabei werden Antigene auf dem MHC-I Molekül den CD8-positiven, zytotoxischen TC präsentiert. In diesem Fall handelt es sich nicht um Antigene von phagozytierten Erregern, sondern um Antigene von Erregern, die sich intrazellulär vermehren, wie beispielsweise virale Erreger. Die Antigene auf dem MHC-II Molekül werden von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt. Die TC erkennen die antigenen Determinanten auf den MHC-Molekülen der DC spezifisch mittels T-Zell Rezeptoren. Dabei steuert eine Vielzahl an Molekülen die Interaktion zwischen den beiden Zellarten. Die Bindung von CD54 (ICAM-1) an den CD11a:CD18-Komplex (LFA-1) beispielsweise trägt zu Adhäsion und Stimulation der TC bei [5]. Daneben spielen auch Moleküle der B7-Familie (CD80 und CD86), die von DC exprimiert werden und mit entsprechenden Molekülen auf TC (CD28) interagieren, eine wichtige Rolle als kostimulatorische Signale. Auch CD43 und CD44 auf der Oberfläche der DC kommt Bedeutung für die Kostimulation und Aktivierung der TC zu [25, 121].

Der Kontakt einer antigen-spezifischen TC mit einer antigen-präsentierenden DC ist der Ausgangspunkt einer immunologischen Kette, die in der Bekämpfung der Pathogene mündet. Neben der Initiierung einer Immunantwort, die sich gegen ein schädliches Pathogen richtet, sind die DC jedoch auch in der Lage, eine autoreaktive Immunreaktion zu verhindern. Dies geschieht, indem sie bei selbstreaktiven TC Anergie, Apoptose oder eine Differenzierung hin zu regulatorischen TC auslösen [113].

Die Aufgaben der DC beinhalten somit die Übermittlung von Information aus den peripheren (Epithel-) Geweben des Körpers zu den lymphatischen Geweben durch die chemotaktische Migration, sowie die Initiierung einer spezifischen Immunantwort gegen pathogene Antigene bzw. die Vermittlung von immunologischer Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Sie verbinden die angeborene mit der adaptiven Immunabwehr und sind entscheidende Modulatoren einer adäquaten Immunreaktion.

### **1.3 Die Toll-like Rezeptoren**

Das Erkennen von Antigenen ist wesentlich für die Funktion der DC. Um Antigene zu erfassen, besitzen DC daher eine bestimmte Art von Rezeptoren, die oben erwähnten TLR. Diese Rezeptoren gehören der Gruppe der PRR an, zu welcher auch die RIG-I-like, die NOD-like, sowie die C-Typ Lektin Rezeptoren zählen [118]. Die TLR finden sich hauptsächlich auf Zellen der angeborenen Immunität, sie existieren aber auch auf Lymphozyten [56], hämatopoetischen Vorläuferzellen [78], sowie weiteren Zellarten, wie Hepatozyten [137] oder Epithelzellen [129].

#### **1.3.1 TLR und ihre Liganden**

Bisher sind 11 verschiedene TLR im Menschen (TLR1-11) und 13 in der Maus (TLR1-13) bekannt [117]. Mit diesen transmembranären Rezeptoren sind die DC und andere Zellen der angeborenen Immunität in der Lage, Pathogene anhand der oben erwähnten PAMPs zu erkennen und entsprechend auf die Pathogene zu reagieren. Zu den PAMPs zählen beispielsweise pathogene Membran- oder DNA-Fragmente. Entscheidend ist dabei, dass diese molekularen Muster absolut spezifisch für Mikroorganismen sind und vom Insekt bis hin zum Vertebraten in keinem anderen Organismus vorliegen [72].

Einige der TLR finden sich auf der Zelloberfläche. Mit ihnen können unter anderem Oberflächenmerkmale der Pathogene wie das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien erkannt werden. Andere TLR dagegen sind intrazellulär an Endosomen oder Lysosomen der Zellen lokalisiert und erkennen dort PAMPs,

die erst nach Phagozytose und Lyse der Pathogene in diesen zellulären Strukturen frei werden. Dies sind beispielsweise pathogene DNA- oder RNA-Fragmente. Die TLR der Zelloberfläche erkennen in erster Linie bakterielle PAMPs, die intrazellulär gelegenen TLR dagegen vor allem PAMPs viralen Ursprungs [1].

Jeder einzelne TLR erkennt ein unterschiedliches Repertoire an PAMPs. Dabei ist es erstaunlich, dass einige der TLR eine große Vielfalt von exogenen und endogenen Liganden erkennen können, die untereinander keinerlei strukturelle Ähnlichkeit besitzen. Der TLR4 beispielsweise erkennt sowohl exogene PAMPs wie LPS oder bestimmte virale Fusionsproteine, ebenso aber auch endogene Liganden wie Hyaluron oder  $\beta$ -Defensin [106]. Eine interessante Antwort auf die Frage, wie sich ein und derselbe Rezeptor an diese Vielzahl unterschiedlicher Liganden anpassen kann, ist die Annahme, dass freiliegende hydrophobe Molekülstrukturen die Aktivierung der Rezeptoren bedingen [106]. Diese hydrophoben Strukturen finden sich auf den PAMPs und werden auch dann frei, wenn es zu Schädigung von körpereigenen Zellen oder Proteinen kommt. So können die TLR nicht nur auf eine Vielzahl von exogenen pathogenen Signalen, sondern auch auf endogene Signale der Zellschädigung oder der malignen Entartung entsprechend reagieren. Zum Ligandenspektrum der TLR zählt man deswegen neben den PAMPs auch die sog. DAMPs (*damage-associated molecular patterns*).

Die TLR unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihrer Liganden und ihrer Lokalisation, sondern auch bezüglich ihrer Expression auf den Zellen. Auf den DC bzw. ihren Vorläufern wird mit Ausnahme der TLR6 und TLR8 das gesamte Spektrum der TLR exprimiert [71].

Tabelle 1 gibt einen Überblick über das Spektrum der TLR, ihre jeweiligen Liganden, die dazugehörenden Pathogene, sowie ihre Lokalisation auf bzw. in den Zellen.



**Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren, ihre spezifischen Liganden (Auswahl), Pathogene, Lokalisation und Expression**

Bisher sind 11 verschiedene TLR (TLR1-11) im Menschen und 13 verschiedene TLR (TLR1-13) in der Maus bekannt. Die TLR können auf der Zelloberfläche oder an intrazellulären Strukturen wie Endosomen oder Lysosomen exprimiert werden. Jeder TLR erkennt dabei ein ganz bestimmtes Repertoire an Liganden.

BC = B-Zelle, CpG = Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin, DC = dendritische Zellen, DNA = Desoxyribonukleinsäure, dsRNA = doppelsträngige Ribonukleinsäure, HSP = Hitzeschockprotein, LPS = Lipopolysaccharid, NK-Zellen = natürliche Killerzellen, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, ssRNA = einzelsträngige Ribonukleinsäure, TC = T-Zelle, ZNS = zentrales Nervensystem (modifiziert nach [71, 117]).

Rezeptor	Liganden	Pathogen	Lokalisation	Expression
TLR1	Triacyl-Lipopeptide	(Myko-)bakterien	Zelloberfläche	Ubiquitär
TLR2	Lipoteichonsäure, LPS, Peptidoglykan, Zymosan	gram-positive Bakterien, Hefen, maligne Zellen	Zelloberfläche	Monozyten, Neutrophile, TC, DC
TLR3	dsRNA, synthetisches Poly I:C	Viren	intrazellulär	NK-Zellen, DC
TLR4	Fibrinogen, Fibronectin, HSP60/70, Hyaluronsäure Lipopeptide, LPS	gram-negative Bakterien, Viren, maligne Zellen, Pflanzen	Zelloberfläche	Makrophagen, Neutrophile, Endothelzellen, TC, DC
TLR5	Flagellin	Bakterien	Zelloberfläche	Monozyten, NK-Zellen, Neutrophile, unreife DC
TLR6	Diacyl-Lipopeptide, Lipoteichonsäure	gram-positive Bakterien, Hefen	Zelloberfläche	Monozyten, Neutrophile, NK-Zellen, BC
TLR7	ssRNA, Imidazoquinolin, Loxoribin, Bropirimin, Guanosinanaloga, synthetisches Imiquimod	Viren, synthetische Komponenten	intrazellulär	Neutrophile, BC, DC-Vorläufer
TLR8				Monozyten, NK-Zellen, Neutrophile, TC
TLR9	CpG-reiche DNA, synthetisches ODN	Bakterien und Viren	intrazellulär	Makrophagen, NK-Zellen, Neutrophile, Mikroglia, DC-Vorläufer
TLR10- TLR13	Möglicherweise Profilin-ähnliche Moleküle	uropathogene Bakterien, ZNS-Infektionen	Zelloberfläche (TLR10 / 11)	TLR10: Neutrophile, BC, DC-Vorläufer

### 1.3.2 Signaltransduktion der TLR

Ihre Liganden erkennen die TLR anhand einer extrazellulär gelegenen, variablen LRR-Domäne (*leucin-rich repeats*). Die Signaltransduktion, die durch die Bindung des Rezeptors an seinen Liganden eingeleitet wird, erfolgt mittels einer zytosolischen Domäne, welche aufgrund ihrer Homologie in TLR und in IL-1 Rezeptoren TIR-Domäne (Toll/IL-1 Rezeptor - Domäne) genannt wird.

Die TLR liegen als Homo- oder Heterodimere vor, deren lose Bindung im inaktiven Zustand sich nach Ligandenbindung stabilisiert. Die Dimerisierung erweitert das Ligandenspektrum der TLR [86] und führt zu einer Konformationsänderung der beiden intrazellulären TIR-Domänen. Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung verschiedener Adapterproteinen an die TIR-Domänen der TLR [33].

Fünf bisher bekannte Adaptermoleküle, die ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen, können mit der TIR-Domäne der TLR eine TIR-TIR Interaktion eingehen und tragen zur Signaltransduktion bei [131]:

- MAL (*MyD88-adaptor-like protein*)
- MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)
- SARM (*Steril  $\alpha$ - and Armadillo-motif-containing protein*)
- TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*)
- TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon- $\beta$* )

Experimente mit MyD88-defizienten Mäusen zeigten, dass dieses Adapterprotein nicht bei allen TLR an der Signalweiterleitung beteiligt ist. Da diese Mäuse trotz der Abwesenheit von MyD88 eine immunologische Antwort auf die Stimulation mit LPS und Poly I:C zeigten, kam es zu der Annahme, dass die beiden Rezeptoren dieser Liganden - TLR4 für LPS und TLR3 für Poly I:C - über einen MyD88-unabhängigen Signalweg verfügen mussten [51].

Die Einteilung der TLR Signalwege erfolgt daher in MyD88-abhängig und MyD88-unabhängig. Vollständig MyD88-unabhängig ist der Signalweg des TLR3, der TLR4 kann sein Signal sowohl MyD88-unabhängig als auch MyD88-abhängig weiterleiten [40, 41]. Für alle weiteren TLR-Subtypen dagegen ist MyD88 für eine intakte Signalweiterleitung essentiell [51, 119].

---

### **Die MyD88-abhängige Signaltransduktion**

Die Bindung von MyD88 an die TIR-Domäne der TLR führt zur Aktivierung zweier IRAK-Kinasen (*Interleukin-1 receptor-associated kinase*), IRAK1 und IRAK4. Die Rekrutierung dieser beiden Kinasen bedingt über verschiedene weitere Moleküle der Signaltransduktion (I $\kappa$ B, IKK-Komplex, TAB2, TAB3, TAK1-Kinase, TRAF6) die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) [52, 131]. Auch einige Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Interferon-Regulator Faktoren (IRF1/5/7), sowie das Activator Protein 1 (AP-1) werden durch die Beteiligung von MyD88 aktiviert [56].

Das Adaptermolekül MAL ist ausschließlich an den MyD88-abhängigen Signalwegen der TLR2 und TLR4 beteiligt und vermittelt die Bindung von MyD88 an die beiden TIR-Domänen des TLR-Rezeptordimers [50].

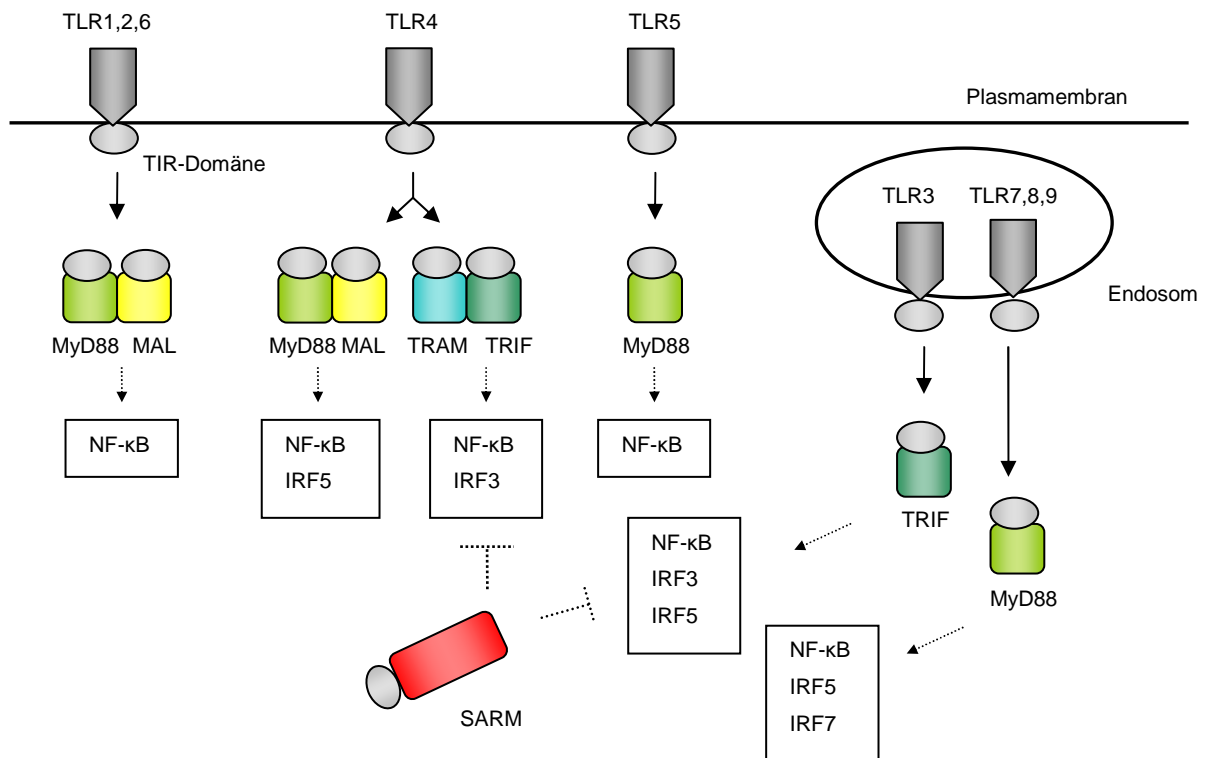
### **Die MyD88-unabhängige Signaltransduktion**

In den MyD88-unabhängigen Signalwegen ist TRIF das entscheidende Adaptermolekül. Es führt zu Bildung eines Signalkomplexes aus verschiedenen Molekülen. Dazu gehören TRAF6, TRADD, Pellino-1, sowie das Rezeptor-interagierende Protein 1 (RIP1) [52]. Dieser Signalkomplex führt MyD88-unabhängig über TAK1 zur Aktivierung von IRF3 und NF- $\kappa$ B [132].

Das Adaptermolekül TRAM ist ausschließlich am MyD88-unabhängigen Signalweg des TLR4 beteiligt und vermittelt die Bindung von TRIF an die TIR-Domäne des TLR4 [27].

Das Adaptermolekül SARM trägt nicht zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bei, sondern fungiert als negativer Regulator [13]. Dabei wird vor allem die TRIF-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TLR3 und TLR4 gehemmt.

Die Signalkaskaden der TLR nach Ligandenbindung münden MyD88-abhängig und MyD88-unabhängig in die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, IRF 3/5/7 und NF- $\kappa$ B. Diese translozieren in den Zellkern und leiten dort die Transkription von Genen zur Synthese proinflammatorischer Zytokine und Interferone ein, wie beispielsweise IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 oder TNF $\alpha$  [85] - wichtige Moleküle für die weitere Immunantwort. Abb. 2 veranschaulicht die Beteiligung der fünf Adaptermoleküle an den Signalwegen der TLR.



**Abb. 2: Beteiligung der fünf Adaptermoleküle MAL, MyD88, SARM, TRAM und TRIF an den Signalwegen der Toll-like Rezeptoren**

Die TLR und ihre Adaptermoleküle besitzen eine TIR-Domäne. Unabhängig vom Adaptermolekül MyD88 ist der TRIF-vermittelte Signalweg des TLR3. Der TLR4 kann sein Signal mit Beteiligung von MyD88 weiterleiten und verfügt über einen alternativen MyD88-unabhängigen Weg mit Beteiligung von TRAM und TRIF. Alle weiteren TLR benötigen MyD88 für eine intakte Signalweiterleitung. MAL ist an den MyD88-abhängigen Signalwegen der TLR1, 2, 4 und 6 beteiligt. Die MyD88-abhängigen Signalwege der TLR5, 7, 8 und 9 leiten ihr Signal ohne MAL-Beteiligung weiter. Das Adaptermolekül SARM hat inhibierenden Einfluss auf die Signalwege mit TRIF Beteiligung. Die TLR Signalwege münden in die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie IRF und NF-κB (modifiziert nach [85]).

IRF = Interferon-Regulator Factor, MAL = MyD88-adaptor-like protein, MyD88 = Myeloid differentiation primary response gene 88, NF-κB = nuclear factor κB, SARM = Steril α- and Armadillo motif-containing protein, TIR = Toll/IL-1 Rezeptor, TLR = Toll-like Rezeptor, TRAM = TRIF-related adaptor molecule, TRIF = TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β.

## 1.4 Die Bruton-Tyrosinkinase

Die Bruton-Tyrosinkinase (Btk) gehört zu den Tyrosinkinasen der Tec-Familie [109] und ist an der Signalvermittlung einer Vielzahl an Rezeptoren beteiligt. Zuerst erkannte man ihre wichtige Funktion in B-Zellen, nach und nach fand man sie darüber hinaus auch in einer Vielzahl weiterer hämatopoetischer Zellen, wie Mastzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Stamm- und Progenitorzellen - sowie den DC [8]. Die Expression der Btk in dieser Vielzahl von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems macht ihre bedeutende Rolle für immunologische Vorgänge deutlich. Darüber hinaus ist eine Expression der Btk jedoch auch in anderen Zellarten wie primären neuronalen Zellen [133] oder Osteoklasten [60] belegt.

### 1.4.1 Proteinstruktur der Btk

Charakteristisch für die fünf Vertreter der Tec-Kinasen (Bmx, Btk, Itk, Rlk, und Tec) ist eine PH-Domäne (*pleckstrin-homology domain*) an ihrem N-terminalen Ende, an die sich eine TH-Domäne (*tec-homology domain*), zwei SH-Domänen (*Src-homology domain*) - SH2 und SH3 - und eine C-terminale SH-Kinasedomäne (SH1) anschließen [69]. Im Falle der Btk umfasst die TH-Domäne eine BH-Domäne (*Btk-homology domain*) aus 27 Aminosäuren und eine prolinreiche Wiederholungssequenz.

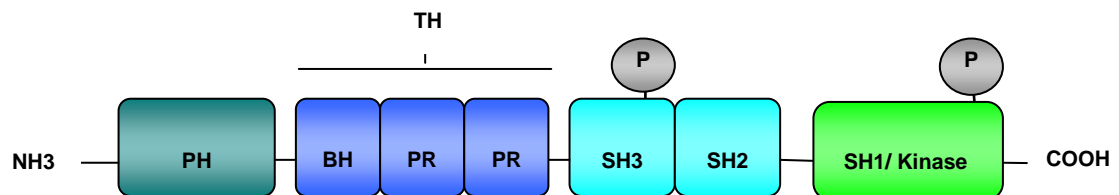
Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Funktion der einzelnen Btk-Domänen, Abb. 3 zeigt schematisch die Molekülstruktur der Btk.

**Tabelle 2: Die fünf Proteindomänen der Btk und ihre Funktionen**

Die Btk gehört zu den Tyrosinkinasen der Tec-Familie und besteht aus fünf verschiedenen Proteindomänen mit jeweils unterschiedlicher Funktion.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, PH = Pleckstrin-homology, SH = SC-homology, TH = Tec-homology (modifiziert nach [84]).

Domäne	Funktion
PH	Bindung des Proteins an die Zellmembran, an Phosphatidylinositolmoleküle und an die Proteinkinase C
TH	Komplexbildung mit $Zn^{2+}$ und Stabilisierung der Proteinstruktur
SH3	Autophosphorylierungsstelle (Y223), Interaktion mit prolinreichen Regionen, Autoregulation der Kinaseaktivität, Bindung von Partnermolekülen
SH2	Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinresten, Autoregulation der Kinaseaktivität, Bindung von Partnermolekülen
SH1	Phosphorylierungsstelle (Y551), Vermittlung der Kinaseaktivität

**Abb. 3: Proteinstruktur der Btk**

Die Btk gehört zu den Tyrosinkinasen der Tec-Familie, sie besitzt fünf verschiedenen Proteindomänen (PH, TH, SH3, SH2, SH1-/Kinase), sowie zwei Phosphorylierungsstellen (P).

BH = Btk-homology, Btk = Bruton-Tyrosinkinase, COOH = C-terminales Ende, NH<sub>3</sub> = N-terminales Ende, PH = Pleckstrin-homology, P = Phosphorylierungsstelle, PR = prolinreiche Region, SH = Src-homology, TH = Tec-homology (modifiziert nach [84]).

### 1.4.2 Die Btk im BCR Signalweg

Einer der Rezeptoren, die ihr Signal mit Beteiligung der Btk in das Zellinnere weiterleiten, ist der auf B-Zellen exprimierte, antigen-bindende B-Zell Rezeptor (BCR), der einen membranständigen Antikörper darstellt. Die Mitwirkung der Btk an diesem Signalweg ist umfassend untersucht. Beispielhaft am Signalweg des BCR soll daher die Rolle der Btk an der Signaltransduktion verdeutlicht werden [8] (siehe Abb. 4):

Wird der BCR durch Bindung eines passenden Antigens an seine extrazelluläre Domäne aktiviert, kommt es zunächst zur Aktivierung einiger nicht-rezeptor-gebundenen Tyrosinkinassen (Syk, Lyn und Fyn). Diese phosphorylieren bestimmte intrazelluläre Anteile des BCR, die sog. ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Dies ermöglicht es der Kinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) an diese Domänen zu binden und ihre Konformation zu ändern. Diese Konformationsänderung führt zur Aktivierung ihrer katalytischen Aktivität, die Btk kann dadurch von Syk innerhalb der SH1-/Kinasedomäne an Position Y551 phosphoryliert und aktiviert werden. Darauf folgt eine Autophosphorylierung der Btk innerhalb ihrer SH3-Domäne an Position Y223. Dies wiederum ermöglicht ihr eine Bindung an verschiedene Substrate.

Syk phosphoryliert und aktiviert zudem eine Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase), wodurch es zur Bildung von Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) kommt. PIP<sub>3</sub> bindet an die PH-Domäne der Btk und trägt dadurch entscheidend zur Signalübertragung bei.

Zusätzlich wird ein weiteres Adapterprotein, das BLNK (*B-cell linker protein*), von Syk phosphoryliert, welches mit der SH2-Domäne der Btk interagiert und die Reaktion mit verschiedenen Effektormolekülen wie der Phospholipase Cy2 (PLCy2) vermittelt.

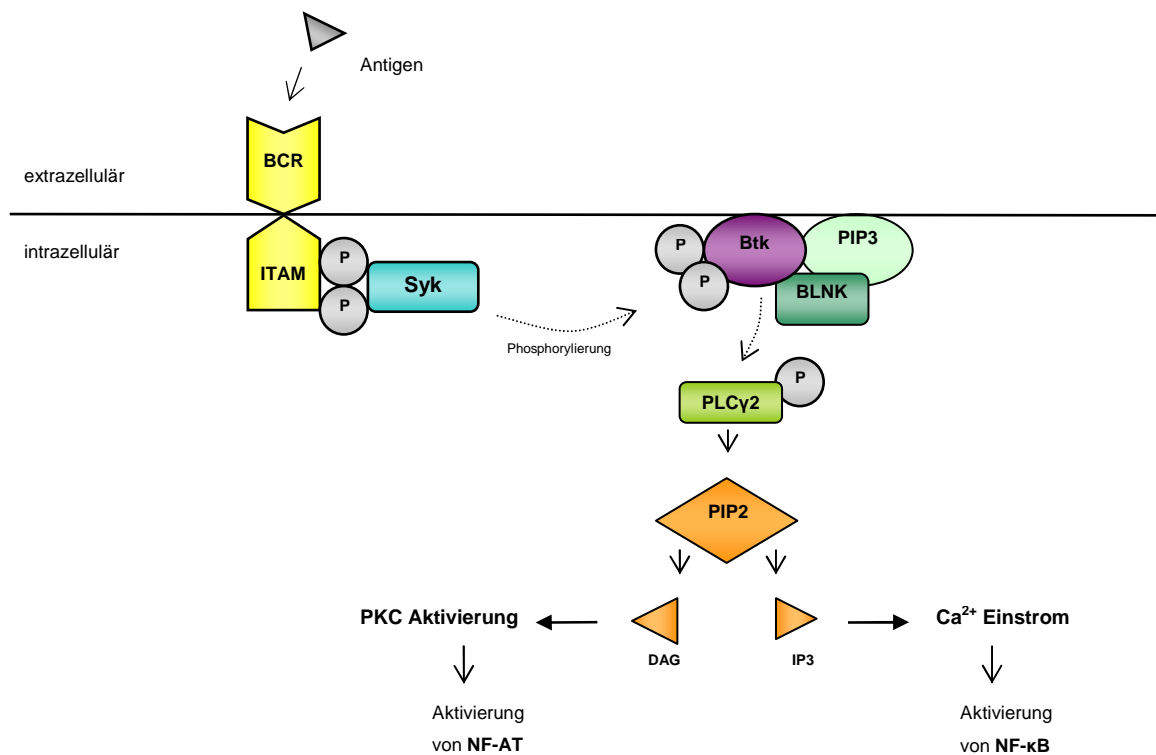
Die eigentliche Kinaseaktivität der Btk besteht in der Phosphorylierung der PLCy2 an den Tyrosinresten Y753 und Y759. PLCy2 vermittelt daraufhin die hydrolytische Spaltung von Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG), zwei wichtige *second messenger*. Weiterhin vermittelt die Btk die Rekrutierung der Phosphatidylinositol-

4-phosphat-5-kinase (PIP5K) zur Plasmamembran. PIP5K wiederum synthetisiert  $\text{PIP}_2$  aus PIP und liefert damit ein wichtiges Substrat für die PLC $\gamma$ 2 [100].

Am Ende der Signalkaskade steht die  $\text{IP}_3$ -vermittelte Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Calciumspeichern und die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinase C (PKC) durch Calcium und DAG. Die daraus folgende Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration führt unter anderem zur Aktivierung einer Calcineurin-Phosphatase und zur Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT, was entscheidend zur Expression bestimmter Gene beiträgt [37]. Durch die PKC erfolgt eine Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie TFII-I [99] oder NF- $\kappa$ B [3]. Die Btk spielt zudem eine Rolle in der BCR-vermittelten Adhäsion von B-Zellen an verschiedene Proteine wie Fibronectin und VCAM-1. Diese Vorgänge bewirken Btk-bedingte Veränderungen im Zytoskelett der Zellen und sind entscheidend für die Migration und Rezirkulation von B-Zellen [111].

Abb. 4 zeigt schematisch die Signalkaskade nach Ligandenbindung an den BCR und die daran beteiligten Moleküle.





**Abb. 4: Schematische Darstellung des BCR Signalwegs**

Nach Bindung eines Liganden (Antigen) an den extrazellulären Anteil des BCR, erfolgt die Rekrutierung verschiedener Proteine (z. Bsp. Syk) an die phosphorylierten intrazellulären Anteile (ITAMs) des Rezeptors, wodurch die Signalkaskade unter Btk-Beteiligung eingeleitet wird. Am Ende des Signalwegs kommt es zum IP<sub>3</sub>-vermittelten Calciumeinstrom in die Zelle und zur Aktivierung der PKC durch Calcium und DAG. Dies wiederum aktiviert Transkriptionsfaktoren wie NF-AT und NF-κB (modifiziert nach [8]).

BCR = B-Zell Rezeptor, BLNK = B-cell linker protein, Btk = Bruton-Tyrosinkinase, DAG = Diacylglycerol, IP<sub>3</sub> = Inositol-trisphosphat, ITAM = Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, NF-AT/NF-κB = Nuclear factor AT/κB (Transkriptionsfaktoren), P = Phosphorylierungsstelle, PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP<sub>3</sub> = Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, PLCy<sub>2</sub> = Phospholipase Cy<sub>2</sub>, Syk = Spleen tyrosine kinase, PKC = Proteinkinase C.

Neben ihrer Beteiligung an der Signalkaskade des BCR spielt die Btk auch für eine Vielzahl weiterer Rezeptoren eine Rolle. Auf den B-Zellen zählt dazu beispielsweise auch das Oberflächenmolekül CD40 [7]. Auch weitere Interaktionspartner der Btk wie das Liar-Protein (*ankyrin repeat domain 54*, ANKRD54) sind bekannt [36]. Darüber hinaus hat die Btk auch Bedeutung für die Signaltransduktion von Integrinrezeptoren, Zytokinrezeptoren und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [89]. Auch Ligandenbindung an einigen der TLR führt zur Btk-Aktivierung [8]. Die Signale an diesen Rezeptoren haben verschiedenste zelluläre Effektormechanismen. Sie regulieren unter anderem die Organisation des Zytoskeletts [134], die intrazelluläre Calciumhomöostase [37], sowie Vorgänge der Zelldifferenzierung, -apoptose [133] und -fusionierung [60].

#### **1.4.3 Die Btk im TLR Signalweg**

Die entscheidende Rolle der Btk im Kontext der Entwicklung von B-Zellen und damit der adaptiven Immunität ist hinreichend belegt. Immer mehr Anhaltspunkte weisen der Btk jedoch auch eine Rolle in den Signalwegen der TLR und damit der angeborenen Immunität zu.

Insbesondere für die beiden MAL-abhängigen TLR2 und 4 ist die Beteiligung der Btk belegt. Eine Aktivierung dieser beiden TLR durch Ligandenbindung führt zur Btk-vermittelten Phosphorylierung von MAL [34, 68]. Dies bewirkt unter Mitwirkung von SOCS-1 die Ubiquitylierung und Degradierung des Moleküls. Diese Inaktivierung von MAL scheint wesentlich für die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu sein [22]. Bleibt die Inaktivierung von MAL durch die Btk nach Stimulation des TLR4 in Btk-defizienten Mäusen aus, führt dies zu einer verminderten Aktivität von NF- $\kappa$ B und damit zu einer verminderten Produktion von NF- $\kappa$ B-induzierten Molekülen wie IL-10 oder TNF $\alpha$  [105]. Neben der Reaktion mit dem Adaptermolekül MAL der TLR2 und 4, sind auch bereits Interaktionen der Btk mit der TIR-Domäne der TLR3, 6, 8 und 9, dem Adaptermolekül MyD88, sowie der Kinase IRAK 1 bekannt [21, 47, 59].

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Interaktion der Btk mit intrazellulären MHC-II Molekülen und CD40 für die Aktivierung der Btk in den TLR Signalwegen verantwortlich ist [63]. CD40 bindet dabei als kostimulatorisches

Molekül an die PH-Domäne der Btk. Ein Fehlen der intrazellulären MHC-II Moleküle und die dadurch ausbleibende Aktivierung der Btk, führen zu einer verminderten Immunantwort nach Stimulation der TLR3, 4 und 9 [63]. Diese Tatsache weist der Btk sowohl in den MyD88-vermittelten, als auch in MyD88-unabhängigen, TRIF-vermittelten TLR Signalwegen eine Rolle zu. Die Interaktion der Btk mit TRIF ermöglicht die vollständige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF-κB, sowie die dadurch bedingte Produktion von Typ-1 Interferonen und inflammatorischen Zytokinen nach Aktivierung der TLR3 und 4. Fehlt die Btk, führt dies zu einer abgeschwächten Antwort nach TLR-Stimulation [63]. Dies macht deutlich, dass die Btk für die Signalwege der TLR zwar keine essentielle Funktion zu besitzen scheint, dennoch aber für eine vollständige Aktivierung entscheidend ist.

#### **1.4.4 Mutationen im Btk Gen – XLA und Xid**

Die Btk ist kodiert auf dem Genlocus Xq21.3-22 des X-Chromosoms [125] und umfasst beim Menschen 37,5 kb [96]. Für dieses Gen ist eine große Anzahl verschiedenster Mutationen beschrieben, die zu einer reduzierten Kinaseaktivität der Btk führen können. Bisher sind beim Menschen über 800 verschiedene Mutationen bekannt [76]. Alle Domänen der Kinase können durch die Mutationen betroffen sein, gehäuft kommen sie jedoch in den beiden C-terminalen Domänen SH2 und SH1 (Kinase) vor [126]. Die Mutationen haben häufig eine unzureichende Enzymfunktion der Btk zur Folge und führen beim Menschen zum Krankheitsbild der Agammaglobulinämie oder XLA (*X-linked Agammaglobulinemia*). Diese auch *Morbus Bruton* genannte Erkrankung betrifft mit einer Inzidenz von 1/200.000 [127] aufgrund der X-chromosomalen Genlokalisierung zumeist Männer und führt zu einer Immundefizienz, bei der in erster Linie die Bildung und die Funktion reifer B-Zellen massiv beeinträchtigt sind.

Erstmalig beschrieben wurde das Krankheitsbild 1952 durch den Pädiater und Namensgeber Ogden Carr Bruton. Er beobachtete verringerte Level an γ-Immunglobulinen im Serum eines an rezidivierenden bronchopulmonalen Infektionen leidenden Jungen [9]. Einige Zeit später konnte das für diese Krankheit

verantwortliche Gen identifiziert werden [75] und schließlich auch die Btk als Produkt dieses Gens [125].

An XLA leidende Patienten besitzen zwar prä-B-Zellen in ihrem Knochenmark [88], in ihrem Blut oder lymphoiden Geweben finden sich jedoch kaum reife B-Zellen [81]. Damit wird die signifikante Bedeutung der Btk für die Reifung der B-Zellen deutlich, ihr Fehlen führt zu einem Block in einem frühen Stadium der B-Zell Entwicklung [92]. Der Übergang von pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen findet ohne die Btk nicht bzw. nur stark vermindert statt. Dieser Schritt der Entwicklung von reifen B-Zellen wird koordiniert über Signale des prä-B-Zell-Rezeptors (prä-BCR). Wie oben ausgeführt, spielt die Btk im Signalweg des BCR - so auch des prä-BCR - eine so große Rolle, dass ihr Fehlen eine intakte Signalweiterleitung und damit die Zellausreifung verhindert [102].

Da aber ohne reife B-Zellen auch die antikörper-bildenden Plasmazellen fehlen, kommt es durch das Fehlen aller Immunglobulinisotypen zu einer charakteristischen Agammaglobulinämie im Blut der Patienten. Die Folgen dieser Immunschwäche sind schwere und rezidivierende bakterielle Infekte, hauptsächlich im Bereich der Atemwege und des Magen-Darm-Trakts, möglicherweise auch mit einem konsekutiv erhöhten Malignomrisiko [6, 39]. Die Infektanfälligkeit der Patienten manifestiert sich meist zwischen dem vierten und zwölften Lebensmonat, da zu diesem Zeitpunkt die plazentagängigen, maternalen  $\gamma$ -Immunglobuline, welche das Neugeborenen noch schützen, metabolisiert wurden [39]. Insgesamt ist die klinische Manifestation der XLA - auch abhängig von der ursächlichen Mutation - sehr variabel, es findet sich neben der erhöhten Infektanfälligkeit beispielsweise auch eine erhöhte Inzidenz inflammatorischer und autoimmuner Erkrankungen wie Enzephalitis [77], Arthritis [116] oder Diabetes mellitus Typ I [101].

Die Therapie der XLA besteht aus einer gezielten Prophylaxe und Behandlung von Infektionen, sowie der intravenösen oder subkutanen Substitution der fehlenden Immunglobuline. Die Prognose und die Therapiemöglichkeiten dieser Krankheit haben sich im Laufe der vergangenen 25 Jahre stetig verbessert [43], neue Ansätze einer Gentherapie stellen sogar eine kurative Therapie in Aussicht [38].

In der Maus führt eine Punktmutation im Btk-Gen im Bereich der PH-Domäne zur sog. X-gekoppelten Immundefizienz (*X-linked immunodeficiency, Xid*), einer der XLA sehr ähnlichen Erkrankung [91]. Allerdings zeigt diese murine Form der Agammaglobulinämie eine geringere phänotypische Ausprägung als im menschlichen Organismus. Eine Erklärung für diese Tatsache bietet die Vermutung, dass die Tec-Kinase der Maus in der Lage ist, das Fehlen der Btk teilweise zu kompensieren, dies beim Menschen aufgrund spezie-spezifischer Unterschiede jedoch nicht möglich ist [23].

#### **1.4.5 Die Bedeutung der Btk für myeloide Zellen**

Neben der wesentlichen Rolle der Btk für die Entwicklung von B-Zellen, bestätigt sich zunehmend auch ihre Beteiligung an der Entwicklung und Funktion des myeloiden Zellkompartiments. Auch die Hinweise auf eine Btk-Mitwirkung an den Signalwegen der TLR (siehe oben) bekräftigen diese Annahme.

In an Xid erkrankten Mäusen konnte eine Reduktion immunologischer Reaktionen verschiedener myeloider Zelltypen beobachtet werden. Beispielsweise kam es zu einer verminderten TLR-vermittelten Aktivierung [138] und einer reduzierten Granularität [46] von Mastzellen. Auch auf die Entwicklung und Funktion von neutrophilen Granulozyten scheint die Btk einen wesentlichen Einfluss zu nehmen [26]. Für Makrophagen hatte das Fehlen der Btk eine Verminderung immunologischer Reaktionen zur Folge, unter anderem waren die Phagozytose und die Bildung radikaler Sauerstoffspezies beeinträchtigt [67]. Darüber hinaus konnte an Btk-Knockout Makrophagen eine Reduktion der TLR-vermittelten Ausschüttung von zytoprotektiven Substanzen gegen oxidativen Stress beobachtet werden [128].

Monozyten, die aus dem Blut von XLA-Patienten gewonnen wurden, zeigten eine beeinträchtigte Phagozytose und Chemotaxis [2]. Daneben gibt es auch Hinweise auf eine verminderte Reifung der DC bei an XLA erkrankten Patienten. Ob dies aber primär auf das Fehlen der Btk zurückzuführen ist oder ein sekundärer Effekt der verminderten B-Zell Funktion ist, ist allerdings noch unklar [24].

Die Beobachtungen an den durch das Fehlen der Btk beeinträchtigten myeloiden Zellen verdeutlichen die Komplexität des Krankheitsbildes der XLA und

veranschaulichen die weitreichende Bedeutung der Enzymfunktion der Btk. Die vollständige Bedeutung und das Ausmaß der physiologischen Konsequenzen dieser offenbar beeinträchtigten Funktion des myeloiden Zellkompartiments für die Immundefizienz durch XLA im humanen Organismus bzw. durch Xid im murinen Organismus, sind bislang jedoch noch ungeklärt.

## **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

Der Phänotyp der an XLA erkrankten Patienten machte schnell die Bedeutung der Btk für eine intakte Entwicklung und Funktion reifer B-Zellen, sowie die wesentliche Rolle dieses Enzyms für die adaptive Immunabwehr deutlich. Die Entschlüsselung des BCR Signalwegs veranschaulichte schließlich ihre molekulare Bedeutung für die Signaltransduktion. Darüber hinaus verdeutlichen neue Erkenntnisse zunehmend den relevanten Stellenwert der Btk für das myeloide Zellkompartiment.

Da die DC als wichtige Vertreter der antigen-präsentierenden Zellen eine herausragende Rolle für eine intakte Immunität spielen, ist die Frage einer Beteiligung der Btk für die Entwicklung und Funktion dieser myeloiden Zellart besonders relevant. Insbesondere die Tatsache, dass die TLR ein wesentlicher Bestandteil für die Funktion der DC sind und sich die Hinweise einer Beteiligung der Btk an den TLR Signalwegen vermehren, macht die Beantwortung dieser Frage bedeutsam. Daher sollten die Versuche dieser Arbeit die Bedeutung der Btk in myeloiden DC veranschaulichen.

Aufschluss über die Rolle der Btk in den DC sollte der Vergleich zwischen Zellen aus wildtypischen Mäusen und Btk-Knockout Mäusen geben. Dazu wurden myeloide DC aus Knochenmarkszellen beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) unter Einwirkung des Wachstumsfaktors GM-CSF kultiviert und auf bestimmte Eigenschaften untersucht, insbesondere nach Stimulation verschiedener TLR durch die jeweiligen Liganden. Von Bedeutung waren dabei die Entwicklung und das Wachstum der Zellen, die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, das Migrationsverhalten, sowie die Fähigkeit der DC zur Stimulation von TC.

Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Btk an einzelnen TLR Signalwegen zu erhalten, wurden die myeloiden DC vor den Experimenten in einzelnen Ansätzen mit den (synthetischen) Liganden der TLR3, 4, 7/8 und 9 stimuliert und die Ansätze untereinander verglichen. Die Auswahl der stimulierten TLR resultierte dabei aus den Erkenntnissen, dass die Btk sowohl an den beiden MAL-abhängigen Signalwegen der TLR2 und 4 beteiligt ist, als auch in der TRIF-vermittelten Signaltransduktion des TLR3 eine Rolle zu spielen scheint. Zusätzlich wurden mit der Auswahl der stimulierten TLR alle Möglichkeiten der MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signaltransduktion abgedeckt. Dadurch sollte eine mögliche Beteiligung der Btk an der MyD88-abhängigen und/oder der MyD88-unabhängigen TLR-Signaltransduktion verdeutlicht werden. MyD88-abhängig sind die Signalwege der TLR7/8 und 9, MyD88-unabhängig dagegen der Signalweg des TLR3. Der TLR4 kann sein Signal sowohl mit, als auch ohne die Mitwirkung von MyD88 weiterleiten (siehe Abb. 2).

Die Ziele der vorliegenden Arbeit können zusammenfassend durch folgende Fragestellungen präzisiert werden:

- Hat die Btk in DC Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung, die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen, das Migrationsverhalten oder die Fähigkeit zur Stimulation von TC?
- Gibt es Hinweise für eine Beteiligung der Btk an den Signalwegen bestimmter TLR nach Ligandenstimulation in DC?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumchlorid	<sup>3</sup> H-Thymidin
BSA	Kaliumchlorid
β-Mercaptoethanol	Natriumazid
Di-Natriumhydrogenphosphat	Natrium-di-hydrogenphosphat
EDTA	Natriumchlorid
Ethanol	Penicillin
FCS	Streptomycin
Glutamin	Trockeneis
GM-CSF	Wasser

#### 2.1.2 Lösungen und Puffer

FACS-Puffer	0,2 %	BSA
	0,1 %	Natriumazid
	in	1xPBS
MACS-Puffer	0,5 %	BSA
	5 mM	EDTA
	in	1xPBS
10xPBS Puffer	11,7 g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	87,65 g	Natriumchlorid
	2,4 g	Natrium-di-hydrogenphosphat
	2 g	Kaliumchlorid
	ad. 1 L	H <sub>2</sub> O



### 2.1.3 Medien für die Zellkultur

GM-CSF-Medium	RPMI-Medium (s.u.)	
	50 ml FCS (10%)	Fa. PAN
	50 ml GM-CSF (10%)	
Migrations-Medium	RPMI-Medium (s.u.)	
	5 ml FCS (1%)	Fa. PAN
RPMI-Medium	500 ml RPMI Grundmedium	Fa. PAN
	500 µl 50 µM β-Mercaptoethanol	Fa. Fluka
	5 ml Glutamin (1%)	Fa. PAN
	5 ml Penicillin/Streptomycin (1%)	Fa. PAN

### 2.1.4 Mauslinien

Wildtypische Mäuse	Black 6, BalbC
Btk-Knockout Mäuse	JAX <sup>®</sup> Mice ( <i>The Jackson Laboratorys</i> ; Bar Harbor, USA)

Es wurden männliche und weibliche Tiere im Alter von 53-101 Tagen verwendet. Die Mäuse wurden im Tierstall der Universität Ulm gezüchtet, bei einem zwölfstündigen Tag-/ Nacht-Rhythmus und einer Umgebungstemperatur von 22 °C. Die Tiere wurden mit ausreichend pelletierter Zuchtnahrung und Wasser versorgt. Für die Experimente wurden die Mäuse zumeist am Tag der Präparation, bzw. maximal drei Tage vorher, aus dem Tierstall in das Labor geholt.

### 2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

αCD4·FITC	Fa. Miltenyi Biotec
αCD8·PE	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD11a·FITC	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD11b·PB	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD11c·APC	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD11c·PE	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD16/CD32 (Fcγ-Block)	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD18·PE	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD43·PE	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD44·FITC	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD45·PerCP (αB220)	Fa. Miltenyi Biotec
αCD54·FITC	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD197·APC	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD184·PE	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αMHCII·FITC	Fa. Miltenyi Biotec

### 2.1.6 Weitere Antikörper

αCD3	Fa. BD Biosciences Pharmingen
αCD28	Fa. BD Biosciences Pharmingen

### 2.1.7 Liganden der TLR

Imiquimod (R837)	Ligand des TLR7/8	Fa. InvivoGen
LPS	Ligand des TLR4	Fa. InvivoGen
ODN 1826	Ligand des TLR9	Fa. InvivoGen
Poly I:C	Ligand des TLR3	Fa. InvivoGen

### 2.1.8 Gebrauchsfertige Kits

MACS <sup>®</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec
---	---------------------

---

### 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe	Fa. Derma Clean
Gewebekulturplatten (6, 24-well)	Fa. Greiner
Gewebekulturplatten (96 well)	Fa. Nunc
Gewebekulturschalen ( <i>non tissue culture</i> , Ø 10 cm)	Fa. BD Falcon
Glaspipetten (1 ml, 2ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Fa. Brand
FACS-Röhrchen	Fa. BD Falcon
Kanülen	Fa. Braun
Küvetten (Kunststoff)	Fa. Brand
Labortücher	Fa. Kimtech Science
Pasteurpipetten	Fa. Brand
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Fa. Gilson
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Fa. Eppendorf
Spritzen (5 ml, 10 ml)	Fa. Braun
Sterilfilter (0,2 µl Maschenweite)	Fa. Millipore
SubQ-Einwegspritze (Ø 0,45 mm)	Fa. Braun
Reaktionsgefäße (1 ml, 2 ml)	Fa. Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml, 25 ml)	Fa. Falcon
Transwellplatten (24 well) (Porengröße 5 µm, Ø 6,5 mm)	Fa. Greiner
Siebeinsätze für Gebekulturplatten	Fa. Greiner
Säulensystem zur T-Zell Aufreinigung (MACS <sup>®</sup> -System)	Fa. Miltenyi Biotec

### **2.1.10 Geräte**

Brutschrank	Fa. Heraeus Instruments
Eismaschine	Fa. Scotsman
Eppendorfzentrifuge	Fa. Heraeus Instruments
FACS Canto II (Durchflusszytometer)	Fa. Becton Dickinson
Feinwaage	Fa. Sartorius
Heizblock	Fa. Roth
Magnetrührer	Fa. IKA Labortechnik
Pipettierhilfe	Fa. Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments
Szintillationszähler	Fa. Perkinelmer Wallac
Tiefkühltruhe (-20°C)	Fa. Liebherr
Tiefkühltruhe (-80°C)	Fa. Heraeus Instruments
Vortexgerät	Fa. Scientific Industries
Wasserbad	Fa. Braun
Zellzähler	Fa. Beckman Coulter
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Fa. Heraeus Instruments

### **2.1.11 Datenverarbeitung**

BD FACSDiva 5.0  
Microsoft Office Excel 2010  
Microsoft Office Word 2010  
Refworks

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zählen von Zellen

Die Zellzahl wurde mit einem Zellzählgerät (*Vi-Cell<sup>TM</sup>XR-cell viability analyzer*, Fa. Beckman Coulter GmbH) bestimmt. Dazu wurden jeweils 50 µl der Zellsuspension mit 450 µl RPMI-Medium in einer Küvette verdünnt. Mithilfe des Gerätes konnte dann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zellkonzentration (Zellzahl/ml) und unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens die absolute Zellzahl in der Suspension ermittelt werden.

### 2.2.2 Zentrifugation von Zellen

Sofern nicht anders vermerkt, erfolgte die Zentrifugation der Zellen mit einer *Megafuge* (Fa. Heraeus) für 5 min bei 1.200 rpm (Raumtemperatur). Im Rahmen der Vorbereitung der Zellen zur durchflusszytometrischen Messung erfolgte eine kurze Zentrifugation für 20 s bei 13.000 rpm (Raumtemperatur).

### 2.2.3 Kultivierung dendritischer Zellen im Brutschrank

Die DC wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung kultiviert (im Folgenden *Brutschrank*). Für die Generierung der DC aus Knochenmarkszellen wurde 5% GM-CSF-haltiges RPMI-Komplettmedium (im Folgenden *GM-CSF-Medium*) verwendet.

### 2.2.4 Präparation von Mäusen

Die Vorläuferzellen der DC wurden aus dem Knochenmark der Röhrenknochen der beiden Hinterläufe der Mäuse (Femur und Tibia) gewonnen. Präpariert wurden dafür jeweils zwei Btk-Knockout Mäuse und eine wildtypische Maus.

Zur Isolierung von TC wurden diverse Lymphknoten und die Milz einer wildtypischen Maus benötigt.

Die Tiere wurden tierschutzgerecht mittels CO<sub>2</sub> getötet. Zusätzlich wurden die Tiere überstreckt und nach Überprüfung der Abwesenheit von Reflexen

(Zwischenzehenreflex) in Rückenlage auf einem Präparationsbrett an den Extremitäten fixiert. Die Bauchhaut wurde mit einer Pinzette leicht angehoben und mit einer Präparierschere entlang der Medianlinie von der Schambeinsymphyse bis zum Kieferwinkel durchtrennt, danach nach lateral hin abgelöst und am Präparationsbrett fixiert.

Um die zervikalen Strukturen freizulegen, wurde die Haut nach kranial bis über die Kieferknochen gezogen. Mit einem Y-Schnitt wurde die Haut der Hinterläufe durchtrennt, zu den Seiten hin abgelöst und ebenfalls fixiert. Anschließend wurde das Peritoneum durchschnitten und die Bauchhöhle geöffnet.

Um Femur und Tibia freizupräparieren, wurden die Knochen der hinteren Extremität mit einer Pinzette gefasst und mittels Schere von Muskeln und umliegenden Gewebe gelöst. Nach Schnitten durch das Hüft- und das Sprunggelenk konnten die Knochen aus den angrenzenden Gelenken mobilisiert und entnommen werden. Mit einem Schnitt durch das Kniegelenk wurde das Femur von Tibia und Fibula getrennt, anschließend konnte die Tibia aus den tibiofibularen Gelenken gelöst werden.

Um an die mesenterialen Lymphknoten zu gelangen, wurden die ventral liegenden Darmschlingen zur Seite hin weggehoben und die Lymphknoten mit einer abgewinkelten Pinzette aus dem Mesenterialstiel herausgelöst. Die zervikalen Lymphknoten konnten nach Durchtrennen und Umschlagen der ventralen Halsmuskulatur freipräpariert und mit der Pinzette entnommen werden. Anschließend wurden Leber und Magen der Maus zur Seite hin weggehoben und die Milz vorsichtig mit einer Pinzette entnommen.

Die präparierten Organe wurden in RPMI-Medium (Komplettmedium ohne FCS) gelegt, alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten steril in der Zellkultur.

### **2.2.5 Generierung dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks**

Von den Enden der präparierten Röhrenknochen (Femur und Tibia beider Hinterläufe) wurde mit der Schere ein kleines Stück soweit abgeschnitten, dass die Markhöhle sichtbar wurde. Das Knochenmark konnte dann mithilfe einer Spritze (0,45 mm Kanüldurchmesser) mit RPMI-Medium (Komplettmedium ohne FCS) aus der Markhöhle herausgespült und in Falconröhrchen aufgefangen werden. Die gewonnene Zellsuspension der beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) wurde zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml GM-CSF-Medium wieder aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und auf eine Dichte von  $3 \times 10^6$ /ml eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension (entsprechend  $3 \times 10^6$  Zellen) wurde in *non tissue culture* Petrischalen (10 cm Durchmesser) pipettiert. In jede Petrischale wurden zuvor 10 ml GM-CSF-Medium gegeben. Die Zellen der beiden Btk-Knockout Tiere und die der wildtypischen Kontrolle wurden dabei jeweils getrennt ausgesät.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte - je nach darauf folgendem Versuch - für neun oder zehn Tage im Brutschrank. Während der Kultivierungszeit erfolgte täglich eine lichtmikroskopische Kontrolle der Petrischalen auf Morphologie der Zellen und mögliche Verunreinigung durch Hefen oder andere Mikroorganismen. Am dritten und sechsten Tag wurden jeder Schale jeweils weitere 5 ml GM-CSF-Medium zugegeben. Nach Ablauf der Generierungszeit wurden die Zellen sorgfältig mit Medium aus den Petrischalen herausgespült, in Falconröhrchen gesammelt und gezählt. Dabei wurden die Zellen der beiden Btk-Knockout Tiere zusammengegeben.

Die Reinheit der generierten Zellpopulation der myeloiden DC wurde im Rahmen der darauf folgenden Experimente anhand der Expression der für myeloide DC typischen Oberflächenmarker CD11b, CD11c und MHC-II durchflusszytometrisch überprüft.

### 2.2.6 Gewinnung von T-Zellen aus Lymphknoten und Milz

Um mögliche Kontaminationen zu beseitigen, wurden Lymphknoten und Milz nach der Präparation kurz in technisches Ethanol eingetaucht. Die Organe wurden anschließend mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein Sieb in ein Well mit 5 ml RPMI-Medium (Komplettmedium ohne FCS) gedrückt und so in Suspension gebracht.

Die Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen, in ein Falconröhrchen mit 10 ml RPMI-Medium (Komplettmedium ohne FCS) überführt und zentrifugiert (5 min, 1.500 rpm). Um die in der Suspension enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, wurde das Zellpellet in 5 ml Ammoniumchlorid (0,16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1.500 rpm) wurden die Zellen wieder in 10 ml RPMI-Medium (Komplettmedium ohne FCS) resuspendiert und gezählt.

#### **Isolierung von T-Zellen mittels MACS<sup>®</sup>-Technik**

Die Isolation der TC aus der Zellsuspension von Lymphknoten und Milz erfolgte durch Selektion der CD4-positiven TC mittels MACS<sup>®</sup>-Technik (*magnetic cell separation*). Dieses Verfahren ermöglicht es, Zellen einer heterogenen Zellpopulation anhand ihrer Oberflächenmarker zu sortieren. Dazu wurde die Zellsuspension entsprechend den Herstellerangaben (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) mit antikörper-gekoppelten magnetischen Partikeln (*CD4 MicroBeads*) inkubiert. CD4-positive TC binden diesen Antikörper und bleiben an einer magnetischen Säule hängen, durch welche die Zellsuspension gespült wird. Anschließend können die so selektierten CD4-positiven TC mit Druck wieder von der Säule abgespült und aufgefangen werden.

Die mit diesem Verfahren aufgereinigten TC wurden auf die Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD45 (B220) durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurde im FSC/SSC-Plot der durchflusszytometrischen Messung zunächst die Zahl der lebenden Zellen markiert und von dieser der prozentuale Anteil an CD4-positiven TC ermittelt. Dieser lag stets über 90%. Dadurch konnte die Reinheit der



CD4-positiven T-Zellpopulation überprüft und eine mögliche Verunreinigung mit CD8-positiven oder CD45 (B220)-positiven Zellen ausgeschlossen werden.

### **2.2.7 Stimulation dendritischer Zellen mit TLR-Liganden**

Die Messungen der Expression von Oberflächenmolekülen, die Experimente zum Migrationsverhalten, sowie die Aktivierung von TC durch DC wurden jeweils mit unstimulierten und mit stimulierten myeloiden DC, generiert aus Knochenmarksvorläuferzellen beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout), durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte am Vortag der Experimente mit den Liganden der TLR3, 4, 7/8 und 9 bei einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$ /ml (Einzelheiten siehe Tabelle 3). Für jeden Genotyp (Wildtyp und Btk-Knockout) der *in vitro* generierten DC ergaben sich somit fünf verschiedene Stimulationsarten: *ohne Stimulation*, *stimuliert mit Poly I:C / LPS / Imiquimod / ODN*. Die absolute Zellzahl und das Zellmedium variierten dabei je nach darauf folgendem Versuch und werden in den einzelnen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

Für die Stimulation wurden die DC je nach Volumen in 6-Well oder 24-Well Gewebekulturplatten überführt. Die Zellen ruhten im Brutschrank vor Zugabe der TLR-Liganden für mind. 2 h. Die Inkubation der DC mit den TLR-Liganden erfolgte dann für mind. 12 h im Brutschrank. Der Ansatz der unstimulierten Zellen beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) wurde ebenso behandelt, es wurde diesem Ansatz jedoch kein TLR-Ligand, sondern ein entsprechendes Volumen an Medium zugegeben.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die für die Stimulation der DC verwendeten TLR-Liganden und deren Konzentration.

**Tabelle 3: Die zur Stimulation der DC verwendeten TLR-Liganden und Konzentrationen**

Die Messungen der Expression von Oberflächenmolekülen, die Experimente zum Migrationsverhalten, sowie die Aktivierung von TC durch DC wurden jeweils mit unstimulierten und mit stimulierten myeloiden DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) durchgeführt. Die Stimulation der DC erfolgte am Vortag der Experimente mit den Liganden der TLR 3, 4, 7/8 und 9 bei einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$ /ml.

DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TC = T-Zelle, TLR = Toll-like Rezeptor.

Rezeptor	Ligand	Endkonzentration
TLR3	Poly I:C	25 µg/ml
TLR4	LPS	1 µg/ml
TLR7	Imiquimod	5 µg/ml
TLR9	ODN	3 µM

### 2.2.8 Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

In diesem Versuch wurde die Fähigkeit der DC gemessen, bestimmte Oberflächenmoleküle zu exprimieren. Dafür wurden unstimulierte und mit verschiedenen TLR-Liganden stimulierte DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) durchflusszytometrisch untersucht. Die Generierungszeit der Zellen für dieses Experiment betrug neun Tage, stimuliert wurde jeweils eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  in RPMI-Medium (zur Stimulation siehe Kapitel 2.2.7).

#### Prinzip der Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse werden die Zellen einzeln in die Messzelle des Durchflusszytometers (*FACS-Gerät*) gebracht und passieren nacheinander einen Laserstrahl. Abhängig von der Größe der Zelle entsteht dabei eine Vorwärtsstreuung des Laserlichtes (*forward scatter, FSC*) und abhängig von der Granularität der Zelle eine Seitwärtsstreuung (*side scatter, SSC*). Die Stärke dieser Streuung wird gemessen und kann - summiert für alle gemessenen Zellen - in einem FSC/SSC-Plot dargestellt werden.

Zusätzlich können die Zellen mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmoleküle markiert werden. Diese Antikörper sind an fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt, welche beim Durchtritt durch das Laserlicht ein Fluoreszenzsignal erzeugen. Dieses Signal wird von einer Messzelle erfasst. So ist es möglich, die Expression dieser Oberflächenmoleküle auf den Zellen quantitativ zu messen. Mit dem verwendeten Durchflusszytometer (FACS Canto II) wurden vier verschiedene Farbstoffe und damit zusätzlich zur Vor- und Seitwärtsstreuung (FSC und SSC) vier verschiedene Oberflächenmoleküle auf einmal gemessen.

Die DC wurden in vier Farbstoffkombinationen auf insgesamt zehn verschiedene Oberflächenmoleküle hin analysiert, für jede durchflusszytometrische Analyse wurde eine Menge von  $0,5 \times 10^6$  Zellen mit den Fluorochromfarbstoffen gefärbt.

Die Farbstoffkombinationen der vier Färbungen und die zugegebene Menge der fluorochrom-markierten Antikörper zeigt Tabelle 4.

**Tabelle 4: Die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörperkombinationen zur Messung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf den DC**

Durch die durchflusszytometrische Messung der Oberflächenmoleküle sollten mögliche Unterschiede in der Expressionsweise dieser Moleküle zwischen wildtypischen DC und Btk-Knockout DC verdeutlicht werden. In den vier aufgeführten Antikörperkombinationen (1-4) wurde die Expressionsweise von insgesamt zehn verschiedenen Oberflächenmolekülen auf den DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) durchflusszytometrisch ermittelt. Die Antikörper sind jeweils an verschiedene Fluorochromfarbstoffe gekoppelt, sie binden an die entsprechenden CD-Moleküle auf den DC und erzeugen beim Durchtritt durch das Laserlicht des Durchflusszytometers ein Fluoreszenzsignal, durch welches die Expression des CD-Moleküls quantitativ ermittelt werden kann. In jeder Antikörperkombination wurden jeweils vier verschiedene Oberflächenmoleküle analysiert. Mit der angegebenen Farbstoffmenge wurde jeweils eine Zahl von  $0,5 \times 10^6$  Zellen gefärbt.

$\alpha$  = Zeichen für Antikörper, APC = Allophycocyanin, Btk = Bruton-Tyrosinkinase, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, MHCII = Majorhistokompatibilitätskomplex II, PB = Pacific blue, PE = Phycoerythrin.

1		2		3		4	
$\alpha$ CD11b · PB	0,1 $\mu$ l	$\alpha$ CD11b · PB	0,1 $\mu$ l	$\alpha$ CD11b · PB	0,1 $\mu$ l	$\alpha$ CD11a · FITC	0,5 $\mu$ l
$\alpha$ CD11c · APC	0,1 $\mu$ l	$\alpha$ CD11c · PE	0,1 $\mu$ l	$\alpha$ CD11c · APC	0,1 $\mu$ l	$\alpha$ CD11b · PB	0,1 $\mu$ l
$\alpha$ CD18 · PE	0,25 $\mu$ l	$\alpha$ CD54 · FITC	0,1 $\mu$ l	$\alpha$ CD43 · PE	0,25 $\mu$ l	$\alpha$ CD11c · APC	0,1 $\mu$ l
$\alpha$ MHCII · FITC	0,25 $\mu$ l	$\alpha$ CD197 · APC	2,5 $\mu$ l	$\alpha$ CD44 · FITC	0,25 $\mu$ l	$\alpha$ CD184 · PE	2,5 $\mu$ l

Jeweils  $2 \times 10^6$  DC wurden am Vortag mit den TLR-Liganden stimuliert, danach aus den Stimulationsplatten in Falconröhrchen pipettiert, zentrifugiert und in 1 ml RPMI-Medium (Komplettmedium mit FCS) wieder aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um die TLR-Stimulation aus den Ansätzen herauszuwaschen, wurden die Zellen zweimal kurz zentrifugiert (20 s bei 13.000 rpm) und in 1 ml PBS wieder aufgenommen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurden die Zellen in 400  $\mu$ l FACS-Puffer sorgfältig resuspendiert und auf vier Ansätze mit je 100  $\mu$ l und damit einer Zahl von  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz verteilt.

Um eine unspezifische Bindung der fluorochrom-markierten Antikörper an den Fc $\gamma$ -Rezeptor der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen vor Zugabe der spezifischen Antikörperkombinationen mit unspezifischen Immunglobulinen der Klasse G (IgG-Blocking Reagenz, Fc $\gamma$ -Block) inkubiert (5 min, 4 °C, dunkel). Die Mischungen der fluorochrom-markierten Antikörper wurden in ihrer jeweiligen Menge pipettiert und mit FACS-Puffer soweit verdünnt, bis jedem Ansatz ein Volumen von 10  $\mu$ l zugegeben werden konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit mit den spezifischen Antikörpern (20-30 min, 4 °C, dunkel), wurden die Zellen nach kurzer Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes in 400  $\mu$ l FACS-Puffer wieder aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Messung von jeweils 50.000 Zellen (entsprechend 50.000 *Events*) mit dem FACS-Gerät.

Da in der durchflusszytometrischen Messung nicht nur lebende Zellen, sondern jeder Partikel erfasst wird, der die Messzelle passiert, wurde aus dem FSC/SSC-Plot zunächst die Fraktion der lebenden Zellen markiert. Aus den lebenden Zellen wurde der Anteil der myeloiden DC anhand der hohen Expression von CD11b und CD11c gefiltert (in jeder Antikörperkombination waren  $\alpha$ CD11b und  $\alpha$ CD11c enthalten). An dieser CD11b-/CD11c-positiven Zellfraktion wurde dann die Höhe der Expression der jeweiligen Oberflächenmoleküle ermittelt. Dazu erfolgte eine prozentuale Aufteilung der DC in *low*, *medium* und *high* – je nachdem, ob sie eine geringe, eine mittlere oder eine hohe Expression des jeweiligen Oberflächenmoleküls aufwiesen. So konnte die Expression der Moleküle quantitativ zwischen wildtypischen und Btk-Knockout Zellen verglichen werden.

### 2.2.9 Durchführung des Migrationsversuchs

Die DC sind in der Lage, sich chemotaktisch entlang eines chemischen Gradienten bestimmter Moleküle (sog. chemotaktische Zytokine oder kurz Chemokine) fortzubewegen und dabei biologische Barrieren, wie z.B. verschiedene Gewebe oder Membranen zu durchwandern. Diese gerichtete Migration (Chemotaxis) sollte in diesem Versuch untersucht werden.

Analysiert wurden dazu unstimulierte und mit verschiedenen TLR-Liganden stimulierte DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout). Die Generierungszeit der DC für dieses Experiment betrug zehn Tage, stimuliert wurde jeweils eine Zahl von  $8 \times 10^6$  Zellen in Migrations-Medium in einer 6-Well Gewebekulturplatte (zur Stimulation siehe 2.2.7).

Die DC wurden in ein System (sog. *Transwells*) gebracht, bei welchem zwei Kammern durch einen Siebeinsatz mit einer Polycarbonatmembran (5  $\mu\text{m}$  Porengröße, 6,5 mm Durchmesser) voneinander getrennt sind. In die obere Kammer wurden die Zellen eingebracht, die untere Kammer enthielt in zellfreiem Migrations-Medium entweder kein Stimulans oder eines der beiden Chemokine MIP-3  $\beta$  bzw. SDF-1  $\alpha$ .

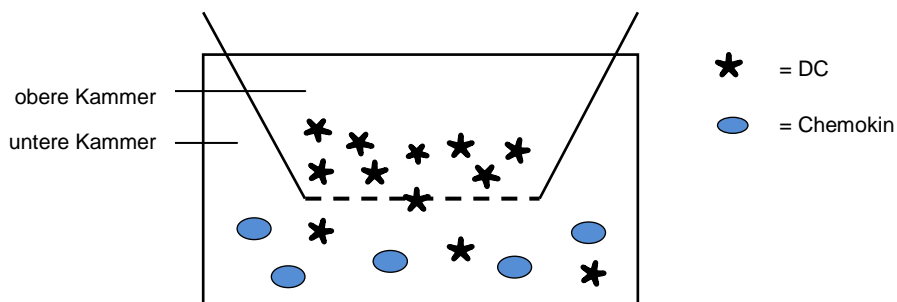
Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Einzelheiten und die Konzentration der verwendeten Chemokine, Abb. 5 zeigt schematisch das Prinzip der Transwells.

**Tabelle 5: Die für die Migrationsversuche verwendeten Chemokine, deren Rezeptoren auf den DC und die verwendeten Konzentrationen**

Die chemotaktische Migration der DC erfolgte in Transwellssystemen entlang eines Gradienten der beiden Chemokine MIP-3  $\beta$  oder SDF-1  $\alpha$ .

DC = dendritische Zellen, CD = Cluster of differentiation, MIP-3  $\beta$  = Mouse macrophage inflammatory protein-3 beta, SDF-1  $\alpha$  = Stromal cell-derived factor-1 alpha.

Chemokin	Synonym	Rezeptor	Stocklösung	Verdünnung	Endkonz.
MIP-3 $\beta$	CCL19	CD197 (CCR7)	100 $\mu\text{g/ml}$	1:200	0,5 $\mu\text{g/ml}$
SDF-1 $\alpha$	CXCR12	CD184 (CXCR4)	100 $\mu\text{g/ml}$	1:200	0,2 $\mu\text{g/ml}$



**Abb. 5: Schema eines Transwellsystems zur Ermittlung des Migrationsverhaltens der DC**

Um die Migrationsfähigkeit der DC zu messen, wurden die Zellen in die obere Kammer des Transwellsystems gebracht, die untere Kammer enthielt entweder eines der beiden Chemokine MIP-3  $\beta$  bzw. SDF-1  $\alpha$  oder kein Stimulans (nur Medium). Die Zellen konnten dann durch einen Siebeinsatz mit einer Polycarbonatmembran (5  $\mu\text{m}$  Porengröße), der beide Kammern voneinander trennt, entlang des chemotaktischen Gradienten in die untere Kammer wandern.

DC = dendritische Zellen, MIP-3  $\beta$  = Mouse macrophage inflammatory protein-3 beta, SDF-1  $\alpha$  = Stromal cell-derived factor-1 alpha.

Die Transwells wurden zunächst am Vortag mit dem Migrations-Medium äquilibriert. Dazu wurden 500  $\mu\text{l}$  des Migrations-Mediums in die untere Kammer pipettiert, die Siebeinsätze eingesetzt und die Platten im Brutschrank für mind. 12 h gelagert.

Die am Vortag stimulierten Zellen wurden sorgfältig aus den Wells der Platten heraus pipettiert, zentrifugiert und in 800  $\mu\text{l}$  Migrations-Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  eingestellt. In die unteren Kammern der Transwells wurden 450  $\mu\text{l}$  Migrations-Medium, sowie entweder eines der beiden Chemokine MIP-3  $\beta$  bzw. SDF-1  $\alpha$  oder Medium ohne Stimulans pipettiert. In die Siebeinsätze (d.h. die obere Kammer) wurden je 100  $\mu\text{l}$  (entsprechend  $1 \times 10^6$  Zellen) der Zellsuspension gegeben. Das gleiche Volumen (100  $\mu\text{l}$ ) der Zellsuspension, der sog. *Input*, wurde in eine Transwellkammer ohne Siebeinsatz gegeben, ebenfalls in ein Endvolumen von 450  $\mu\text{l}$  Migrations-Medium. Der *Input* enthielt gemäß der Versuchstheorie dabei genau die Anzahl an Zellen, die jeweils in die oberen Kammern der Transwells gegeben wurde und diente als Referenzwert für die Zahl der in die untere Kammer migrierten Zellen. Dabei wurde auf eine bestmögliche Durchmischung der Zellsuspension geachtet, um eine homogene

Verteilung der Zellen und eine homogene Konzentration von  $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  in der Suspension zu erhalten.

Der Migrationsansatz erfolgte jeweils zweifach in Dubletts, der Input einzeln. Damit blieben nach Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Ansätze für jede Stimulationsart  $100 \mu\text{l}$ . Von diesem Volumen wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  (entsprechend  $0,5 \times 10^6$  Zellen) durchflusszytometrisch auf die Oberflächenmarker CD11b, CD11c und MHC-II untersucht, um die Reinheit der Zellpopulation an DC sicherzustellen.

Abb. 6 zeigt schematisch die Anordnung des Versuches auf den Transwellplatten.

	WT				Btk-KO			
	ohne Stimulans	MIP3 $\beta$	SDF1 $\alpha$	Input	ohne Stimulans	MIP3 $\beta$	SDF1 $\alpha$	Input
ohne Stimulation	○ ○	○ ○	○ ○	○	● ●	● ●	● ●	●
Poly I:C	○ ○	○ ○	○ ○	○	● ●	● ●	● ●	●
LPS	○ ○	○ ○	○ ○	○	● ●	● ●	● ●	●
Imiquimod	○ ○	○ ○	○ ○	○	● ●	● ●	● ●	●
ODN	○ ○	○ ○	○ ○	○	● ●	● ●	● ●	●

**Abb. 6: Anordnung des Migrationsversuches auf den Transwellplatten**

Mit dem Migrationsversuch sollten mögliche Unterschiede zwischen wildtypischen DC und Btk-Knockout DC in ihrer Fähigkeit zur Chemotaxis verdeutlicht werden. Die DC der beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) migrierten in fünf TLR-Stimulationsarten (ohne Stimulation / Poly I:C / LPS / Imiquimod / ODN) auf jeweils drei verschiedene Chemokin-stimulationen (ohne Stimulans / Mib-3  $\beta$  / SDF-1  $\alpha$ ). Die Anordnung erfolgte jeweils zweifach in Dubletts (●●/○○). Für jede Stimulationsart stellte der entsprechende Input die Referenz zur Zahl der migrierten Zellen dar.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, DC = dendritische Zellen, Btk-KO = Btk-Knockout, LPS = Lipopolysaccharid, MIP-3  $\beta$  = Mouse macrophage inflammatory protein-3 beta, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, SDF-1  $\alpha$  = Stromal cell-derived factor-1 alpha, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

Nach 4 h Migrationszeit im Brutschrank wurden die Siebeinsätze mit einer Pinzette aus den Transwellkammern herausgehoben und das Medium (450  $\mu$ l) mit den migrierten Zellen sorgfältig aus der unteren Kammer in FACS-Röhrchen überführt, ebenso wurde mit den jeweiligen Inputs verfahren. Abhängig davon, wie viele Zellen durch die Siebeinsätze in die untere Kammer des Transwellsystems migriert waren, befanden sich in dem Volumen von 450  $\mu$ l eine jeweils unterschiedliche Anzahl an Zellen. Diese Zellzahl wurde ermittelt, indem die Suspensionen am FACS-Gerät 60 s lang gezählt wurden, in dieser Zeit wurde von den einzelnen Ansätzen ein immer gleiches Volumen Flüssigkeit auf die darin in unterschiedlicher Konzentration enthaltenen Zellen analysiert. Danach wurde im FSC/SSC-Plot aus allen gemessenen Werten die Fraktion der lebenden Zellen markiert und dieser Wert für die Auswertung herangezogen. Für jeden Zelltyp (Wildtyp und Btk-Knockout) in jeder der fünf Stimulationsarten (*ohne Stimulation / Poly I:C / LPS / Imiquimod / ODN*) und für jede der drei chemotaktischen Stimulationen (*ohne Stimulans (Medium) / MIP-3  $\beta$  / SDF-1  $\alpha$* ) ergab sich so ein Wert.

Jeder dieser Werte wurde prozentual ins Verhältnis zum jeweiligen Input gesetzt. Entsprechend der Versuchstheorie repräsentierte der Input die Menge an Zellen, welche in die obere Migrationskammer gegeben wurde, es galt daher: *Wert des Inputs = 100%*. So konnte von allen in die obere Kammer gegebenen Zellen der prozentuale Anteil der Zellen ermittelt werden, die in die untere Kammer migrieren konnten. Für die Gesamtauswertung wurden aus den Werten der Einzelexperimente der Mittelwert und der SEM (*standard error of the mean*) ermittelt.



### 2.2.10 Durchführung der Kokultivierung dendritischer Zellen mit T-Zellen

Eine wesentliche Funktion der DC ist es, Antigene aufzunehmen, diese naiven TC zu präsentieren und die TC in einer Zell-Zell Interaktion zu Proliferation und Differenzierung anzuregen. Diese Aktivierung der TC durch DC ist Voraussetzung für eine adäquate Immunantwort. In dem Versuch der Kokultivierung wurde die Fähigkeit der DC zur Aktivierung von TC untersucht. Analysiert wurden dazu unstimulierte und mit verschiedenen TLR-Liganden stimulierte DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout). Die Generierungszeit der DC für dieses Experiment betrug zehn Tage, stimuliert wurde jeweils eine Zellzahl von  $3 \times 10^5$  in RPMI-Medium (Komplettmedium mit FCS) in einer 24-Well Gewebekulturplatte (zur Gewinnung der TC und Stimulation der DC siehe 2.2.6 und 2.2.7).

Die Höhe der Aktivierung der TC wurde anhand ihrer Zellteilungsrate gemessen. Dazu wurde den Zellen Tritium-markiertes Thymidin zugegeben. Thymidin dient als Pyrimidin-Nucleosid der Neusynthese der DNA bei der Zellteilung. Wird der Wasserstoff dieses Moleküls durch das Wasserstoffisotop Tritium ( $^3\text{H}$ ) ersetzt, kann die Radioaktivität dieses  $\beta$ -Strahlers detektiert werden. Nach Zugabe eines Szintillationreagens wird die  $\beta$ -Strahlung des Tritiums von einem Szintillator erfasst, die Höhe der gemessenen Strahlung korreliert dabei mit der Menge an eingebautem Tritium und damit der Proliferationsrate der Zellen.

Die am Vortag stimulierten DC wurden sorgfältig aus den Wells der Platten heraus pipettiert, zentrifugiert in 600  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium (Komplettmedium mit FCS) auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  eingestellt. Die aus Lymphknoten und Milz isolierten TC wurden gezählt, zentrifugiert und je nach Zellzahl in einem entsprechenden Volumen RPMI-Medium (Komplettmedium mit FCS) auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  eingestellt. Zur Kokultivierung der Immunzellen wurden daraufhin für jede TLR-Stimulationsart 100  $\mu\text{l}$  (entsprechend  $0,5 \times 10^5$  Zellen) der DC mit 100  $\mu\text{l}$  (entsprechend  $1 \times 10^5$  Zellen) der TC in ein Well einer *nunc*lon surface 96-Well-platte in einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  zusammengebracht.

Der negativen Kontrolle dienten Ansätze, die nur TC ohne jegliche Aktivierung enthielten. Hierfür wurden 100 µl der TC-Zellsuspension (entsprechend  $1 \times 10^5$  Zellen) und 100 µl RPMI-Medium (Komplettmedium mit FCS) in die Wells pipettiert.

Die positive Kontrolle erfolgte durch Ansätze, welche TC enthielten, die mit CD3- und CD28-Antikörpern ( $\alpha$ CD3 bzw.  $\alpha$ CD28) maximal aktiviert wurden. Für die drei Wells der positiven Kontrolle erfolgte am Vortag ein Coating mit dem CD3-Antikörper. In jedes Well wurden dazu 50 µl PBS-Puffer mit dem Antikörper ( $\alpha$ CD3) in einer Endkonzentration von 2 ng/ml pipettiert und inkubiert (4 °C für mind. 12 h). Am Folgetag wurde die Flüssigkeit des  $\alpha$ CD3-Coatings abgesaugt und 100 µl der TC-Zellsuspension (entsprechend  $1 \times 10^5$  Zellen) in die Wells pipettiert. Zusätzlich wurde den drei Wells der CD28-Antikörper in 100 µl RPMI-Medium in einer Endkonzentration von 0,5 ng/ml zugegeben.

Ferner erfolgten Ansätze, welche nur DC in jeder TLR-Stimulationsart enthielten, diese repräsentierten die Grundproliferation der DC. Hierfür wurden 100 µl (entsprechend  $0,5 \times 10^5$  Zellen) der DC-Zellsuspension und 100 µl RPMI-Medium (Komplettmedium mit FCS) pipettiert.

Der Versuch zur Kokultivierung enthielt damit folgende Ansätze:

- *TC allein* (negative Kontrolle)
- *TC stimuliert mit  $\alpha$ CD3/CD28* (maximale TC-Stimulation, positive Kontrolle)
- *WT-DC allein* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)
- *WT-DC kokultiviert mit TC* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)
- *Btk-KO-DC allein* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)
- *Btk-KO-DC kokultiviert mit TC* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)

Alle Ansätze wurden jeweils dreifach in Triplets angeordnet und enthielten ein Endvolumen von 200 µl.

Abb. 7 zeigt schematisch die Versuchsanordnung auf den 96-Well Platten.

	WT		Btk-KO	
	DC	DC + TC	DC	DC + TC
ohne Stimulation	○ ○ ○	○ ○ ○	● ● ●	● ● ●
Poly I:C	○ ○ ○	○ ○ ○	● ● ●	● ● ●
LPS	○ ○ ○	○ ○ ○	● ● ●	● ● ●
Imiquimod	○ ○ ○	○ ○ ○	● ● ●	● ● ●
ODN	○ ○ ○	○ ○ ○	● ● ●	● ● ●
	TC	TC + αCD3/CD28		
Kontrollen	● ● ●	● ● ●		

**Abb. 7: Versuchsanordnung der Kokultivierung von DC mit TC in der 96-Wellplatte**

Mit dem Kokultivierungsversuch sollten mögliche Unterschiede zwischen wildtypischen DC und Btk-Knockout DC in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung von TC verdeutlicht werden. Für beide Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) erfolgten in jeder Stimulationsart ein Ansatz nur mit DC und ein Ansatz von DC in Kokultivierung mit TC. Ein Ansatz nur mit TC stellte die negative Kontrolle dar, die positive Kontrolle einer maximalen TC-Stimulation erfolgte durch einen Ansatz, der TC mit αCD3/CD28 enthielt. Die Anordnung erfolgte jeweils dreifach in Triplets (●●●/ooo).

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, Btk-KO = Btk-Knockout, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TC = T-Zelle, WT = Wildtyp, αCD3/CD28 = CD3- bzw. CD28-Antikörper.

Nach 48 h Kokultivierungszeit im Brutschrank wurden in jedes Well 20  $\mu\text{l}$  Tritium-markiertes Thymidin pipettiert (1  $\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$  in RPMI-Medium 1:10 verdünnt) und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Um die Zellen zu lysieren, wurde die Platte daraufhin kurz eingefroren ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ca. 2 h) und wieder aufgetaut.

Die Ausmessung der Tritium-Strahlung erfolgte mithilfe eines *96-MicroCell-Harvester*. Dieses Gerät saugt die flüssigen Inhalte der Wells durch eine Filtermatte und überträgt so die lysierten Zellen auf die Matte. Jedem Well der Platte ist dabei ein markiertes Feld auf der Filtermatte zugeordnet. Die Filtermatte wurde für 5 min in einer Mikrowelle getrocknet und in eine Folie gegeben. 4 ml Szintillationslösung wurden gleichmäßig mit einer Walze über der Filtermatte in der Folie verteilt und die Folie dann verschweisst. Mit einem Szintillationszähler wurde daraufhin die Intensität der  $\beta$ -Strahlung des Tritiums für jedes einzelne Feld der Filtermatte (entsprechend den einzelnen Wells der verschiedenen Ansätze) ausgelesen (in *counts per minute*, cpm) und so die Proliferationsraten der in den einzelnen Ansätzen enthaltenen Zellen ermittelt.

Für jede TLR-Stimulationsart wurde der jeweilige Wert der Grundproliferation der DC (Ansätze *DC allein*) von dem Proliferationswert der Kokultivierung (Ansätze *DC kokultiviert mit TC*) subtrahiert. Dadurch konnte die Proliferationsrate der TC aus dem Kokultivierungsansatz ermittelt werden, nachdem diese durch die in dem Ansatz enthaltenen DC stimuliert und zur Proliferation angeregt wurden.

### **2.2.11 Statistik**

Aus den Daten der Einzelexperimente wurden jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung und der T-Test errechnet. Als statistisch signifikant galten dabei p-Werte unter 0,05. Die statistische Datenverarbeitung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2010.

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Entwicklung dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen

Um DC zu generieren, wurden aus wildtypischen und aus Btk-Knockout Mäusen Femur und Tibia beider Hinterläufe präpariert und das Knochenmark aus den vier Röhrenknochen herausgespült. Die so isolierten Knochenmarkszellen wurden in einem GM-CSF-haltigen Nährmedium ausgesät und je nach darauf folgenden Versuch für neun oder zehn Tage kultiviert. Dadurch wurden myeloide DC generiert (siehe 2.2.4 und 2.2.5). Vor und nach der Kultivierungszeit wurde die Zellzahl bestimmt und die Vervielfachung der Zellzahl, d.h. die Generierungseffizienz der Zellen (= Anzahl der generierten Zellen / Anzahl der ausgesäten Zellen) errechnet. Dadurch sollte ein möglicher Einfluss der Btk auf die GM-CSF-vermittelte Differenzierung der DC aus den Progenitorzellen des Knochenmarks verdeutlicht werden. Um zu untersuchen, ob aufgrund der X-chromosomalen Genlokalisierung der Btk das Geschlecht der Mäuse Einfluss auf das Ergebnis nimmt, erfolgte die Auswertung für männliche und weibliche Tiere getrennt.

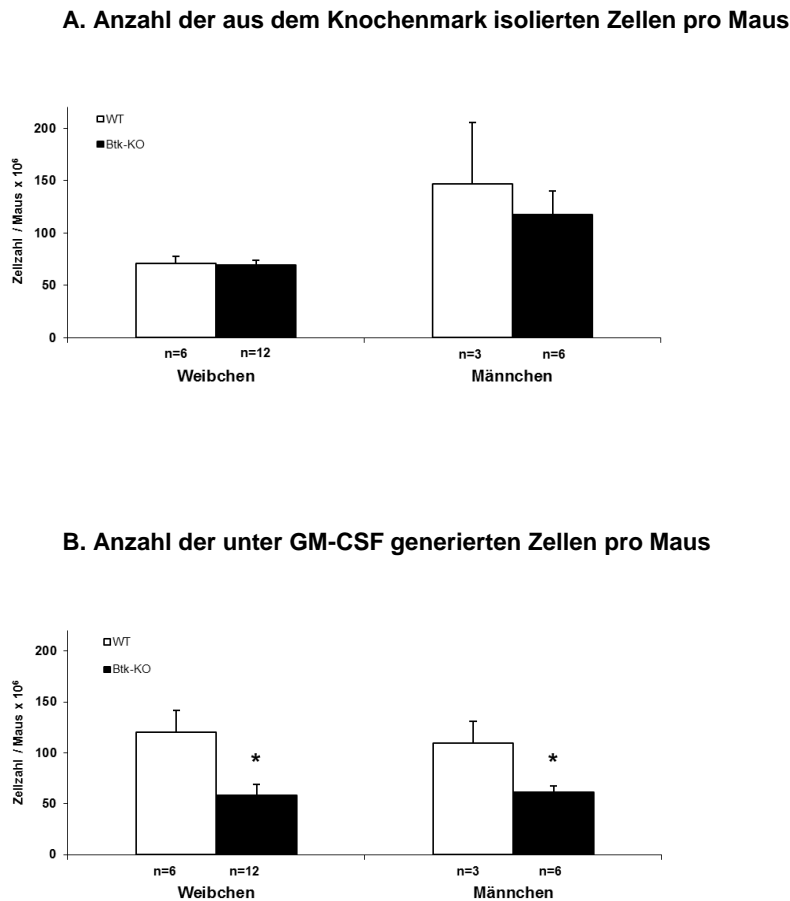
Die Anzahl an Knochenmarkszellen, die durchschnittlich pro Maus aus den vier präparierten Röhrenknochen gewonnen werden konnte, unterschied sich zwischen wildtypischen und Btk-Knockout Mäusen nicht wesentlich. Dies galt sowohl für die männlichen, als auch für die weiblichen Tiere. Die Bedeutung der Btk wurde jedoch nach Kultivierung der Knochenmarkszellen mit GM-CSF deutlich, denn die Zellen der Btk-Knockout Mäuse zeigten bei beiden Geschlechtern eine signifikant geringere Generierungseffizienz, d.h. aus derselben Anzahl ausgesäter Progenitorzellen des Knochenmarks entwickelte sich aus den Btk-Knockout Zellen im Vergleich zu den wildtypischen Zellen eine geringere Anzahl an myeloiden DC.

Bei den Weibchen zeigten die DC der wildtypischen Mäuse eine Generierungseffizienz von 1,7, die der Btk-Knockout Mäuse dagegen eine Generierungseffizienz von 0,8 ( $p = 0,02$ ).

Bei den Männchen zeigten die DC der wildtypischen Mäuse eine Generierungseffizienz von 0,7, die der Btk-Knockout Mäuse dagegen eine Generierungseffizienz von 0,5 ( $p = 0,03$ ).

Das Fehlen der Btk resultierte bei beiden Geschlechtern in einer signifikant verringerten Generierungseffizienz der DC.

Abb. 8 zeigt das Ergebnis der Auswertung.



**Abb. 8: Zellzahlen / Maus (Femur und Tibia beider Hinterläufe) der beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) nach Isolation der Zellen aus dem Knochenmark (A.), sowie nach Kultivierung mit GM-CSF (B.) für Weibchen und für Männchen**

Sowohl aus wildtypischen, wie auch aus Btk-Knockout Mäusen wurden Femur und Tibia beider Hinterläufe präpariert und die Knochenmarkszellen aus diesen Röhrenknochen gespült und gezählt (A.). Danach wurden die Knochenmarkszellen ausgesät und differenzierten unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors GM-CSF zu myeloiden dendritischen Zellen. Nach Ablauf der Generierungszeit wurden die Zellen erneut gezählt (B.). So konnte die Generierungseffizienz (= Anzahl der generierten Zellen / Anzahl der ausgesäten Zellen) der DC zwischen den beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) verglichen werden. Bei beiden Geschlechtern zeigen die Btk-Knockout Zellen eine signifikant geringere Generierungseffizienz als die wildtypischen Kontrollen.

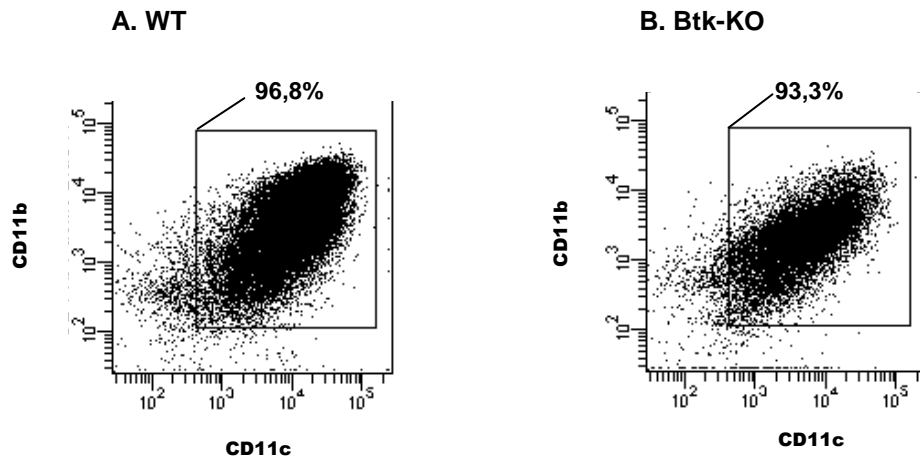
**A.** Mittelwerte und SEM (*standard error of the mean*) der Zahl an Knochenmarkszellen, die pro Maus aus den vier Röhrenknochen (Femur und Tibia beider Hinterläufe) isoliert werden konnte. **B.** Mittelwerte und SEM der Zahl an myeloiden DC, die nach Aussäen und Kultivierung der isolierten Zellen pro Maus generiert werden konnte.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, DC = dendritische Zellen, GM-CSF = Granulozyten-/Makrophagenkolonie stimulierender Faktor, WT = Wildtyp, n = Anzahl der biologischen Replikate.

Aufgrund der verminderten Generierungseffizienz der Btk-Knockout Zellen, wurden für jedes Experiment eine wildtypische Maus und zwei Btk-Knockout Mäuse präpariert. So konnte nach der Kultivierung mit GM-CSF für beide Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) eine ähnlich hohe Anzahl an myeloiden DC generiert werden.

Die durch den Einfluss von GM-CSF generierten DC wurden vor Durchführung der Experimente durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit anhand der Expression der für myeloide DC charakteristischen Oberflächenmarker CD11b, CD11c und MHC-II überprüft. Die Zellpopulationen bestanden dabei stets zu mind. 70 % aus Zellen, die eine hohe Expression an CD11b, CD11c und MHC-II aufwiesen, der Anteil lag jedoch meist über diesem Wert. Die Reinheit der wildtypischen und Btk-Knockout myeloiden DC war dabei stets vergleichbar.

Abb. 9 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung an wildtypischen (Abb.9 A), sowie an Btk-Knockout DC (Abb.9 B).



**Abb. 9: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung von CD11b und CD11c zur Kontrolle der Reinheit der Zellpopulation der myeloiden DC. A. Messung von Zellen einer wildtypischen Maus, B. Messung von Zellen einer Btk-Knockout Maus**

Vorläuferzellen des Knochenmarks wurden ausgesät und differenzierten unter dem Einfluss von GM-CSF zu myeloiden DC. Nach der Generierungszeit wurde die Reinheit der Zellpopulation durchflusszytometrisch anhand der Expression von CD11b, CD11c und MHC-II überprüft. Exemplarisch sind die Ergebnisse einer Messung dargestellt. Die beiden dargestellten Plots beinhalten jeweils den Anteil der lebenden Zellen aus den FSC/SSC-Plots. Der Anteil der Zellen, die CD11b und CD11c in hohem Maße exprimieren, ist markiert und prozentual errechnet, er entspricht dem Anteil an myeloiden DC in der Zellpopulation.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, FSC = forward scatter (Vorwärtsstreuung), GM-CSF = Granulozyten-/Makrophagenkolonie stimulierender Faktor, SSC = side scatter (Seitwärtsstreuung), WT = Wildtyp.

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Analysen der Zellentwicklung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Gesamtzahl an Knochenmarkszellen scheint nicht wesentlich durch die Enzymfunktion der Btk beeinflusst zu sein.
- Die Btk scheint eine bedeutende Rolle für die GM-CSF vermittelte Differenzierung der DC aus den Progenitorzellen des Knochenmarks zu spielen, was sich zunächst in einer signifikant verringerten Generierungseffizienz widerspiegelt.
- Das Geschlecht der Mäuse hat keinen Einfluss auf diese Beobachtungen.



---

### 3.2 Analyse von charakteristischen Oberflächenmarkern dendritischer Zellen

Die DC exprimieren eine Vielzahl an Molekülen auf ihrer Oberfläche, zu denen die MHC-Moleküle, Chemokinrezeptoren und Integrine zählen. Diese Moleküle steuern und koordinieren die Aufgaben der DC und ermöglichen ihnen die Kommunikation und Interaktion mit anderen Zellen. Da diese Moleküle für eine intakte Funktion der DC von großer Bedeutung sind, wurde durchflusszytometrisch vor allem die Expression einiger wichtiger Integrine, Chemokinrezeptoren und des MHC-II Moleküls auf den DC untersucht (siehe 2.2.8). Analysiert wurden die Oberflächenmoleküle MHC-II, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD43, CD44, CD54 (ICAM-1), CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7).

Ziel dabei war es, mögliche Unterschiede der Expression von Oberflächenmarkern zwischen wildtypischen und Btk-Knockout DC zu veranschaulichen. Viele dieser Oberflächenmoleküle werden verstärkt durch Stimulation der Zellen, zum Beispiel mit TLR-Liganden, exprimiert, da diese Stimulation zur Reifung der DC beiträgt. Um darüber hinaus die Beteiligung der Btk an den MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen der TLR zu untersuchen, erfolgten die Messungen an unstimulierten und an stimulierten DC. Die Stimulation erfolgte mit den Liganden der TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS), TLR7/8 (Imiquimod), sowie TLR9 (ODN).

Nach der durchflusszytometrischen Messung der Expression der Oberflächenmoleküle erfolgte die prozentuale Aufteilung der DC in *low*, *medium* und *high* – je nachdem, ob sie eine geringe, eine mittlere oder eine hohe Expression des jeweiligen Moleküls aufwiesen. So konnte die Expression der Oberflächenmoleküle zwischen wildtypischen und Btk-Knockout Zellen verglichen werden.

Da die Expression der Oberflächenmoleküle in den Einzelmessungen quantitativ sehr unterschiedlich ausgeprägt war, konnten die Einzelergebnisse statistisch nicht zusammengefasst werden, für jede Messung erfolgte der Vergleich zwischen wildtypischen und Btk-Knockout Zellen daher separat. Die Ergebnisse werden im Folgenden einzeln für die verschiedenen TLR-Stimulationsarten aufgeführt.

---

### 3.2.1 Expression von MHC-II

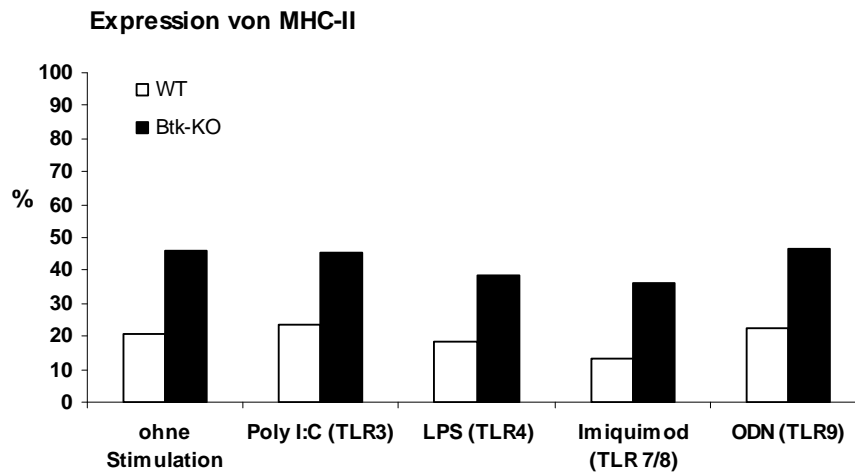
Auf dem MHC-II Molekül erfolgt die Präsentation von phagozytierten Antigenen für CD4-positive TC. Für die Funktion der DC als wichtige antigen-präsentierende Zellen hat dieses Molekül daher einen erheblichen Stellenwert.

Die Messungen der Expression dieses Oberflächenmoleküls zeigten folgende Ergebnisse:

- *Ohne Stimulation (n=7)*: in allen sieben Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine höhere MHC-II Expression.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=5)*: in allen fünf Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine höhere MHC-II Expression.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=7)*: in allen sieben Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine höhere MHC-II Expression.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=6)*: in allen sechs Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine höhere MHC-II Expression.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=6)*: in allen sechs Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine höhere MHC-II Expression.

Btk-Knockout DC scheinen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte Expression des MHC-II Moleküls aufzuweisen, Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten, insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.

Abb. 10 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer für die erhöhte Expression des MHC-II Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen repräsentativen Messung:



**Abb. 10: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der MHC-II Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des MHC-II Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*low*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen erhöhte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

### 3.2.2 Expression von CD11a

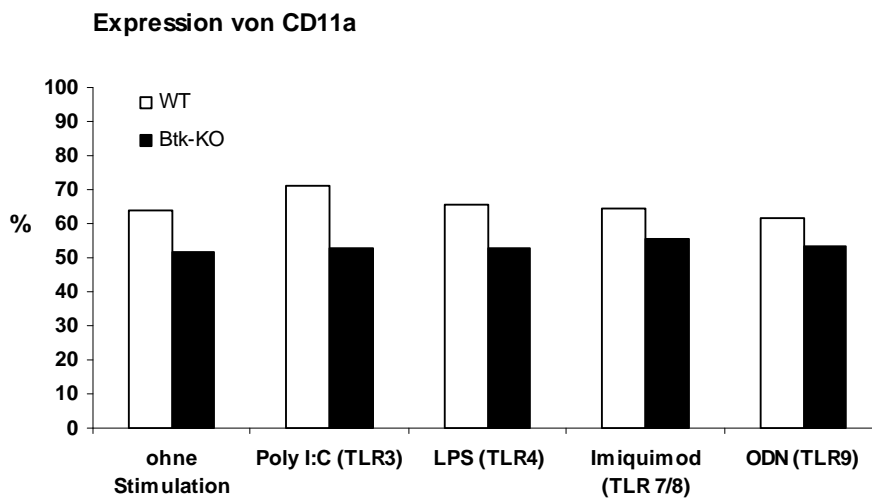
CD11a assoziiert mit CD18 und bildet die  $\alpha$ -Kette des CD11a:CD18-Komplexes (LFA-1). CD11a:CD18 vermittelt als kostimulierender Faktor der immunologischen Synapse die Adhäsion der DC mit TC und erfüllt weitere Funktionen wie die Adhäsion an und Transmigration durch Endothelzellen.

Eine Einzelmessung der Expression dieses Moleküls zeigte folgendes Ergebnis:

- *Ohne Stimulation (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD11a Expression.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD11a Expression.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD11a Expression.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD11a Expression.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD11a Expression.

Btk-Knockout DC scheinen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte Expression des CD11a Moleküls aufzuweisen, Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten, insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.

Abb. 11 zeigt das Ergebnis der Messung der Expression des CD11a Moleküls:



**Abb. 11: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD11a Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des CD11a Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*low*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen verminderte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

### 3.2.3 Expression von CD11b und CD11c

Die beiden Oberflächenmoleküle CD11b und CD11c sind - neben dem MHC-II Molekül - Marker der myeloiden DC und dienen daher in erster Linie der Kontrolle und Markierung der dendritischen Zellpopulation nach der Zellgenerierung mittels GM-CSF. Der prozentuale Anteil an CD11b-/CD11c-positiven Zellen lag für beide Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) stets bei mind. 70% (siehe 3.1, sowie Abb. 9).

Unterschiede in der Expression dieser Marker zeigten sich zwischen wildtypischen DC und Btk-Knockout DC nicht.

### 3.2.4 Expression von CD18

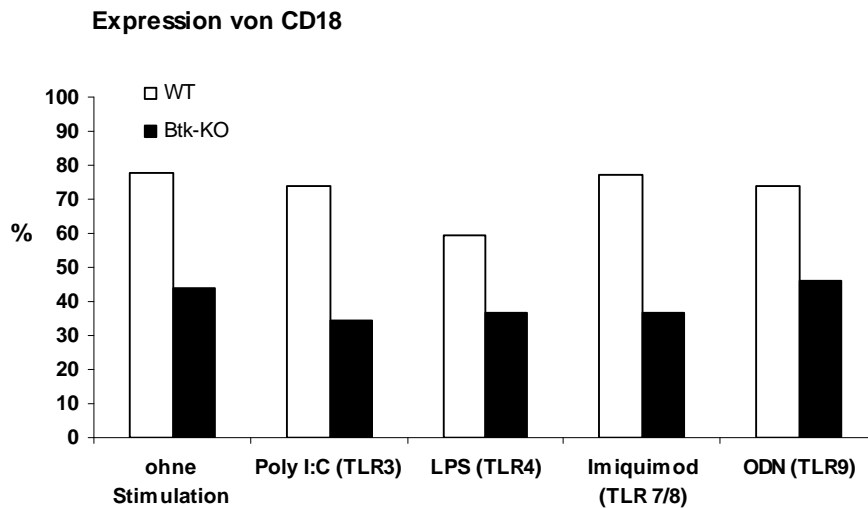
Das CD18 Molekül bildet die  $\beta$ -Kette des CD11a:CD18-Komplexes (LFA-1) und assoziiert mit CD11a. CD11a:CD18 vermittelt als kostimulierender Faktor der immunologischen Synapse die Adhäsion der DC mit TC und erfüllt weitere Funktionen wie die Adhäsion an und Transmigration durch Endothelzellen.

Die Messungen der Expression dieses Oberflächenmoleküls zeigten folgende Ergebnisse:

- *Ohne Stimulation (n=8)*: in allen acht Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD18 Expression.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=5)*: in vier Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD18 Expression, in einer Messung eine erhöhte.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=8)*: in sieben Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD18 Expression, in einer Messung eine erhöhte.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=7)*: in allen sieben Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD18 Expression.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=6)*: in fünf Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD18 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.

Trotz einzelner Abweichungen in wenigen Einzelmessungen lässt sich in den Experimenten insgesamt erkennen, dass Btk-Knockout DC gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte Expression des CD18 Moleküls zu zeigen scheinen. Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten, insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.

Abb. 12 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer für die erniedrigte Expression des CD18 Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen repräsentativen Messung:



**Abb. 12: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD18 Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des CD18 Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*medium*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen verminderte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

### 3.2.5 Expression von CD43

Das CD43 Molekül (Leukosialin/Sialophorin) ist an der Migration der DC beteiligt und spielt darüber hinaus eine Rolle für die Aktivierung von TC.

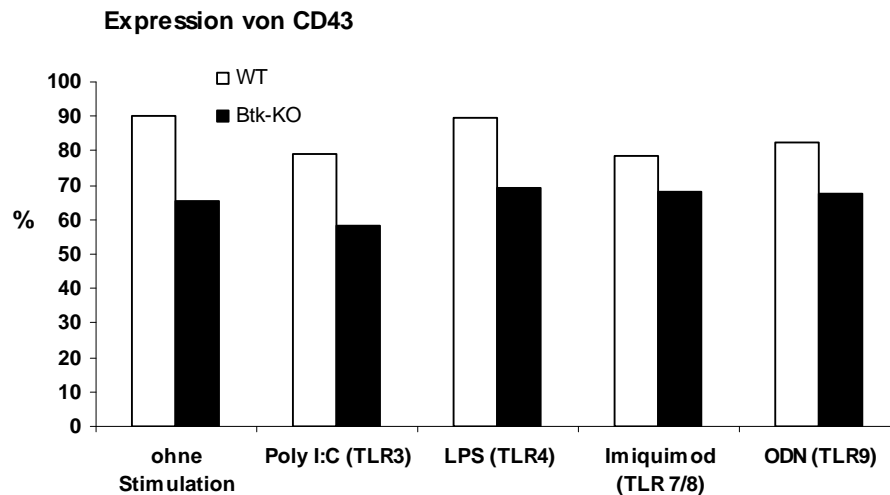
Die Messungen der Expression dieses Oberflächenmoleküls zeigten folgende Ergebnisse:

- *Ohne Stimulation (n=3)*: in zwei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD43 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=2)*: in einer Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD43 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=3)*: in allen drei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD43 Expression.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=2)*: in beiden Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD43 Expression.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=3)*: in allen drei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD43 Expression.

Trotz einzelner Abweichungen in wenigen Einzelmessungen lässt sich in den Experimenten insgesamt erkennen, dass Btk-Knockout DC gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte Expression des CD43 Moleküls zu zeigen scheinen. Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten, insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.



Abb. 13 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer für die erniedrigte Expression des CD43 Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen repräsentativen Messung:



**Abb. 13: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD43 Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des CD43 Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*low*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen verminderte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, Btk-KO = Btk-Knockout, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

### 3.2.6 Expression von CD44

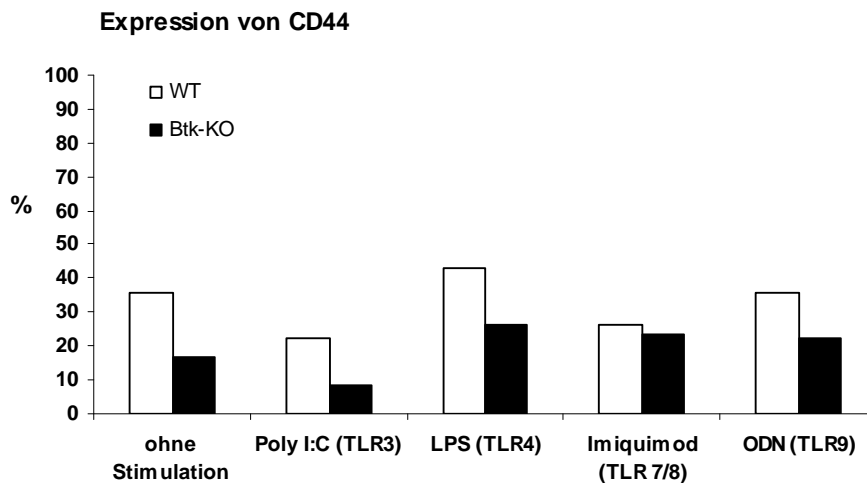
Das Oberflächenmolekül CD44 ist an der Aktivierung und Kostimulation von TC beteiligt.

Die Messungen der Expression dieses Oberflächenmoleküls zeigten folgende Ergebnisse:

- *Ohne Stimulation (n=8)*: in sechs Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD44 Expression, in zwei Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=5)*: in allen fünf Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD44 Expression.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=8)*: in vier Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD44 Expression, in zwei Messungen eine höhere und in zwei Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=7)*: in drei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD44 Expression, in vier Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=6)*: in vier Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte CD44 Expression, in zwei Messungen eine erhöhte.

Trotz einzelner Abweichungen in wenigen Einzelmessungen lässt sich in den Experimenten insgesamt erkennen, dass Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte Expression des CD44 Moleküls zu zeigen scheinen. Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten, insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.

Abb. 14 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer für die erniedrigte Expression des CD44 Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen repräsentativen Messung:



**Abb. 14: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD44 Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des CD44 Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*low*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen verminderte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

### 3.2.7 Expression von CD54 (ICAM-1)

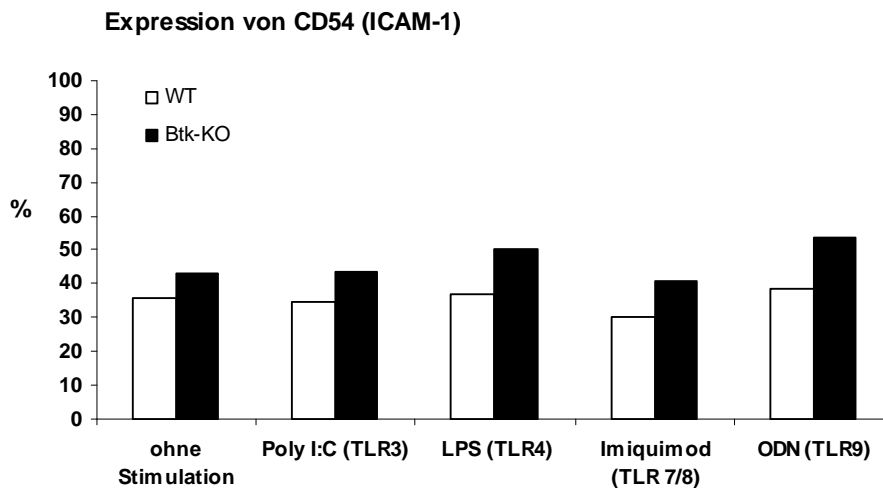
CD54 (ICAM-1) ist der Ligand des LFA-1 Komplexes und wie dieser beteiligt an der Adhäsion der DC mit TC.

Die Messungen der Expression dieses Oberflächenmoleküls zeigten folgende Ergebnisse:

- *Ohne Stimulation (n=3)*: in zwei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD54 Expression, in einer Messung eine erniedrigte.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD54 Expression.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=3)*: in zwei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD54 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=2)*: in beiden Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD54 Expression.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=3)*: in zwei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD54 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.

Trotz einzelner Abweichungen in wenigen Einzelmessungen lässt sich in den Experimenten insgesamt erkennen, dass Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte Expression des CD54 Moleküls zu zeigen scheinen. Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten, insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.

Abb. 15 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer für die erhöhte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen repräsentativen Messung:



**Abb. 15: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD54 (ICAM-1) Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des CD54 (ICAM-1) Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*high*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen erhöhte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR= Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

### 3.2.8 Expression von CD184 (CXCR4)

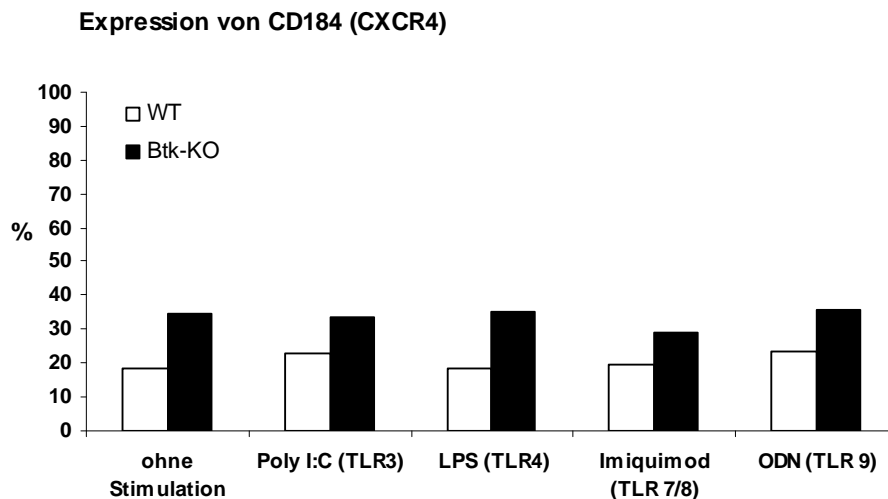
CD184 (CXCR4) ist der Rezeptor für das Chemokin SDF-1  $\alpha$  (CXCL12). Dieses Rezeptormolekül ermöglicht den DC daher das Erkennen chemotaktischer Signale und eine zielgerichtete Migration.

Die Messungen der Expression dieses Oberflächenmoleküls zeigten folgende Ergebnisse:

- *Ohne Stimulation (n=2)*: in einer Einzelmessung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD184 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD184 Expression.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=2)*: in einer Einzelmessung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD184 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=2)*: in einer Einzelmessung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD184 Expression, in einer Messung gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=1)*: in der Messung zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte CD184 Expression.

Btk-Knockout Zellen scheinen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erhöhte Expression des CD184 Moleküls aufzuweisen, Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten, insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.

Abb. 16 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer für die erhöhte Expression des CD184 Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen repräsentativen Messung:



**Abb. 16: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD184 (CXCR4) Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des CD184 (CXCR4) Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*low*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen erhöhte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

### 3.2.9 Expression von CD197 (CCR7)

CD197 (CCR7) ist der Rezeptor für das Chemokin MIP-3  $\beta$  (CCL19). Neben CD184 (CXCR4) trägt auch dieses Molekül zur chemokin-vermittelten Fortbewegung der DC bei.

Die Messungen der Expression dieses Oberflächenmoleküls zeigten folgende Ergebnisse:

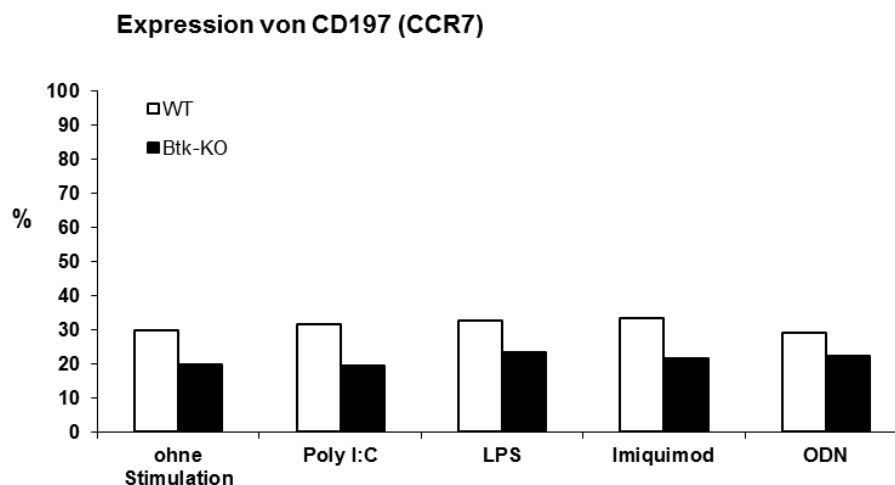
- *Ohne Stimulation (n=8)*: in vier Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine niedrigere CD197 Expression, in einer Messung eine erhöhte Expression und in drei Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR3 mit Poly I:C (n=5)*: in drei Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine niedrigere CD197 Expression, in zwei Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR4 mit LPS (n=8)*: in sechs Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine niedrigere CD197 Expression, in zwei Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod (n=7)*: in fünf Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine niedrigere CD197 Expression, in zwei Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.
- *Stimulation des TLR9 mit ODN (n=7)*: in vier Einzelmessungen zeigten die Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine niedrigere CD197 Expression, in drei Messungen gab es zwischen den beiden Mauslinien keine Unterschiede.

Trotz einzelner Abweichungen in wenigen Einzelmessungen lässt sich in den Experimenten insgesamt erkennen, dass Btk-Knockout Zellen gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine erniedrigte Expression des CD197 Moleküls zu zeigen scheinen. Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten,



insbesondere zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen, gab es dabei nicht.

Abb. 17 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer für die erniedrigte Expression des CD197 Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen repräsentativen Messung:



**Abb. 17: Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD197 (CCR7) Expression auf myeloiden dendritischen Zellen**

Analysiert wurde die Expression des CD197 (CCR7) Moleküls auf DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation verschiedener TLR. Die Diagramme zeigen den Prozentsatz an DC mit dem für diese Messung höchsten Expressionslevel (*medium*). Die Ergebnisse weisen auf eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen verminderte Expression des Moleküls durch die Btk-Knockout Zellen für alle TLR-Stimulationsarten hin.

Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

Durch die durchflusszytometrische Analyse der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auf unstimulierten und auf mit TLR-Liganden stimulierten DC sollten mögliche Unterschiede zwischen wildtypischen und Btk-Knockout Zellen, sowie zwischen einzelnen TLR-Stimulationsarten verdeutlicht werden. Es wurden dafür sowohl TLR mit MyD88-abhängigem Signalweg (TLR4, TLR7/8, TLR9), sowie TLR mit MyD88-unabhängigem Signalweg (TLR3, TLR4) stimuliert.

---

Die Ergebnisse der Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen erhöhte Expression scheinen die Btk-Knockout DC für MHC-II, CD54 (ICAM-1) und CD184 (CXCR4) aufzuweisen.
- Eine gegenüber den wildtypischen Kontrollen erniedrigte Expression scheinen die Btk-Knockout DC für CD11a, CD18, CD43, CD44 und CD197 (CCR7) aufzuweisen.
- Die Unterschiede in der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle zeigten sich unabhängig von den einzelnen TLR-Stimulationsarten, es gab keine durchgängigen Unterschiede zwischen TLR mit MyD88-abhängigem Signalweg und TLR mit MyD88-unabhängigem Signalweg.

### **3.3 Analyse des Migrationsverhaltens**

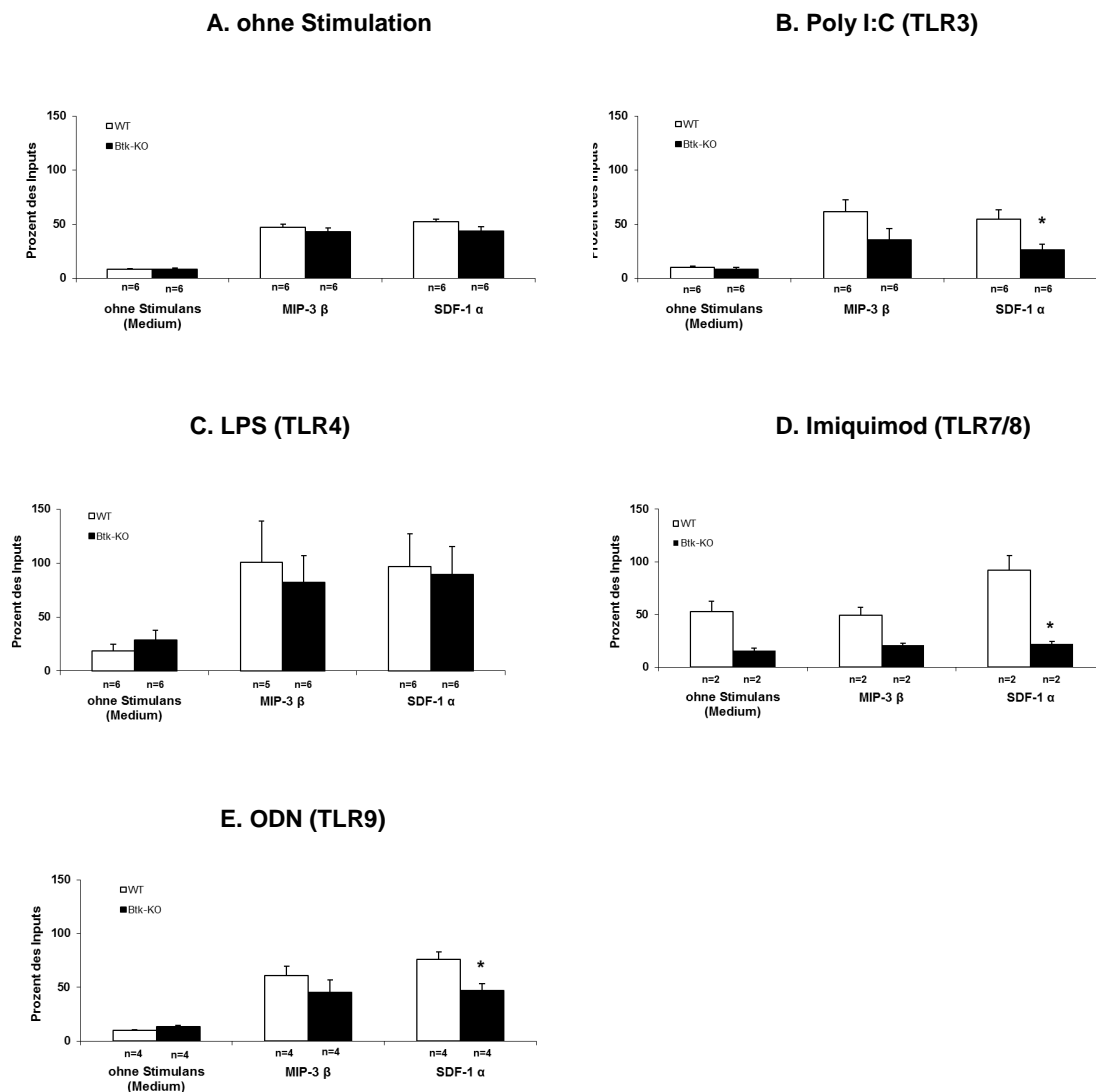
Eine wesentliche Funktion der DC ist es, Antigene in den peripheren Geweben aufzunehmen und diese in die lymphatischen Organe zu transportieren, um sie dort Lymphozyten mithilfe von MHC-Molekülen zu präsentieren. Die Fortbewegung der Zellen erfolgt über eine chemotaktisch gesteuerte, lymphogene Migration. Deshalb sollte durch das Experiment zum Migrationsverhalten untersucht werden, ob sich die DC aus Btk-Knockout Mäusen in ihrer Fähigkeit zu Transmigration und Chemotaxis von DC aus wildtypischen Mäusen unterscheiden. Um darüber hinaus die Beteiligung der Btk an den MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen der TLR zu untersuchen, wurden die Versuche mit unstimulierten und mit stimulierten DC durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit den Liganden für TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS), TLR7/8 (Imiquimod), sowie TLR9 (ODN).

Unstimulierte und stimulierte Zellen beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) wurden in getrennten Ansätzen in die obere Kammer eines Transwellsystems gegeben und konnten entlang eines Chemokingradienten (MIP-3  $\beta$  oder SDF-1  $\alpha$ ) durch die Poren eines Siebeinsatzes in die untere Kammer des Transwellsystems wandern. Zusätzlich gab es einen dritten Ansatz ohne Zugabe eines Chemokins. Die Zahl der migrierten Zellen in der unteren Kammer wurde mit dem Input als Referenzwert verglichen. Ermittelt wurde

dadurch der prozentuale Anteil an Zellen, der in die untere Kammer migrieren konnte, von allen in die obere Kammer gegebenen Zellen (siehe 2.2.9).

Für jede Stimulationsart (*ohne Stimulation / Poly I:C / LPS / Imiquimod / ODN*) wurden die Werte der beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) für die jeweilige chemotaktische Stimulation (*ohne Stimulans (Medium) / MIP-3 $\beta$  / SDF-1 $\alpha$* ) verglichen. In die Auswertung konnten je nach Stimulationsart 1 bis 3 Migrationsversuche miteinbezogen werden. Da die Ansätze pro Versuch jeweils doppelt waren, ergab sich abhängig von der Stimulationsart eine Versuchsanzahl von  $n = 2$  (Imiquimod),  $n = 4$  (ODN) bzw.  $n = 6$  (ohne Stimulation, Poly I:C, LPS).

Abb. 18 zeigt das Ergebnis der Migrationsversuche.



**Abb. 18: Ergebnisse der Migrationsversuche**

Für die Versuche wurden unstimulierte und mit verschiedenen TLR-Liganden stimulierte DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) in die obere Kammer eines Transwellensystems gebracht, die untere Kammer enthielt entweder eines der beiden Chemokine MIP-3  $\beta$  bzw. SDF-1  $\alpha$  oder kein Stimulans (nur Medium). Die Zellen konnten dann entlang eines Chemokingradienten in die untere Kammer migrieren. Die Diagramme stellen die Mittelwerte der Migrationsraten der DC (in Prozent des Inputs), sowie den SEM (*standard error of the mean*) für die Stimulationen mit Liganden verschiedener TLR dar. Für jede Stimulationsart (A-E) erfolgte die Migration der Zellen auf drei verschiedene chemotaktische Stimuli (ohne Stimulans (Medium) / MIP-3  $\beta$  / SDF-1  $\alpha$ ). Erkennbar ist eine Reduktion der Migrationsfähigkeit der Zellen der Btk-Knockout Mäuse gegenüber den wildtypischen Kontrollen in allen Stimulationsarten. **A.** Migrationsrate ohne TLR-Stimulation. **B.** Migrationsrate nach Stimulation des TLR3 mit Poly I:C. **C.** Migrationsrate nach Stimulation des TLR4 mit LPS. **D.** Migrationsrate nach Stimulation des TLR7/8 mit Imiquimod. **E.** Migrationsrate nach Stimulation des TLR9 mit ODN. Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, MIP-3  $\beta$  = Mouse macrophage inflammatory protein-3 beta, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, SDF-1  $\alpha$  = Stromal cell-derived factor-1 alpha, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp, n = Anzahl der Einzelexperimente.

---

Ohne Stimulation durch einen TLR-Liganden unterschieden sich die DC der beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) in ihrem Migrationsverhalten nur wenig voneinander (Abb. 18 A). Die Chemokinese der unstimulierten Zellen ohne einen chemotaktischen Reiz (Ansatz *ohne Stimulans*) betrug durchschnittlich nur ca. 9% der Zellen. Auf den chemotaktischen Stimulus durch MIP-3  $\beta$  oder SDF-1  $\alpha$  erhöhte sich die Migrationsrate bei beiden Mauslinien dagegen auf durchschnittlich ca. 50%.

Nach Stimulation der TLR3, 4, 7/8 und 9 durch entsprechende Liganden, erhöhte sich zum einen der Prozentsatz der migrierten Zellen, zum anderen wurden dadurch auch Unterschiede der Migrationsfähigkeit zwischen den wildtypischen und den Btk-Knockout Zellen deutlich (Abb. 18 A-E).

Signifikant geringer zeigte sich die Migrationsrate der Btk-Knockout Zellen auf die chemotaktische Stimulation von SDF-1  $\alpha$  nach Stimulation des TLR3 (Signalweg MyD88-unabhängig,  $p = 0,02$ ), TLR7/8 (Signalweg MyD88-abhängig,  $p = 0,03$ ), sowie TLR9 (Signalweg MyD88-abhängig,  $p = 0,02$ ). Trotz fehlenden Signifikanzniveaus war eine tendenziell reduzierte Migrationsfähigkeit der Btk-Knockout DC auch für die chemotaktische Stimulation durch SDF-1  $\alpha$  nach Stimulation des TLR4 durch LPS (Signalweg MyD88-ab und -unabhängig), sowie für die chemotaktische Stimulation durch MIP-3  $\beta$  für alle TLR-Stimulationsarten erkennbar.

Der Vergleich der Ansätze der verschiedenen chemotaktischen Stimuli (*ohne Stimulans (Medium) / MIP-3  $\beta$  / SDF-1  $\alpha$* ) macht deutlich, dass die DC neben der Aktivierung durch einen TLR-Liganden auch einen chemotaktischen Stimulus benötigen, um effizient migrieren zu können. Ohne die Zugabe eines Chemokins (Ansatz *ohne Stimulans*) lag der Prozentsatz der migrierten Zellen mit TLR-Stimulation je nach Stimulationsart zwischen 10% - 30%. In den Ansätzen jedoch, die einen chemotaktischen Stimulus enthielten, erhöhte sich die Migrationsrate bei den wildtypischen Zellen um ein Vielfaches und lag meist über 50%. Auch die Btk-Knockout Zellen zeigten auf den chemotaktischen Stimulus einen Anstieg der Migrationsrate, wenn auch weniger deutlich als die wildtypischen Kontrollen.

Durch die Versuche zu Chemotaxis und Migrationsverhalten sollte ein möglicher Einfluss der Btk auf diese Funktionen der DC verdeutlicht werden. Um mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen TLR-Stimulationsarten zu untersuchen, wurden für die Experimente sowohl TLR mit MyD88-abhängigem Signalweg (TLR4, TLR7/8, TLR9), als auch TLR mit MyD88-unabhängigem Signalweg (TLR3, TLR4) stimuliert.

Die Ergebnisse der Experimente zum Migrationsverhalten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Btk-Knockout DC scheinen eine verminderte, chemotaktisch gesteuerte Migrationsfähigkeit zu besitzen, eine intakte Enzymfunktion der Btk scheint für die volle Migrationsfähigkeit der DC erforderlich zu sein.
- Das unterschiedliche Migrationsverhalten zwischen den beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) zeigte sich sowohl nach Stimulation von TLR mit MyD88-abhängigen, als auch nach Stimulationen von TLR mit MyD88-unabhängigem Signalweg.

### **3.4 Analyse der Kokultivierung dendritischer Zellen mit T-Zellen**

Die DC stimulieren in den lymphatischen Organen TC, die einen spezifischen T-Zell Rezeptor zu den von den DC präsentierten Antigenen besitzen. Dadurch werden weitere immunologische Reaktionen initiiert. Das Experiment der Kokultivierung sollte Aufschluss darüber bringen, ob sich die DC der Btk-Knockout Mäuse in ihrer Fähigkeit, TC zu aktivieren von den DC aus wildtypischen Mäusen unterscheiden.

Um darüber hinaus die Beteiligung der Btk an den MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen der TLR zu untersuchen, erfolgten die Versuche mit unstimulierten und mit stimulierten DC. Die Stimulation erfolgte mit den Liganden der TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS), TLR7/8 (Imiquimod), sowie TLR9 (ODN).

---

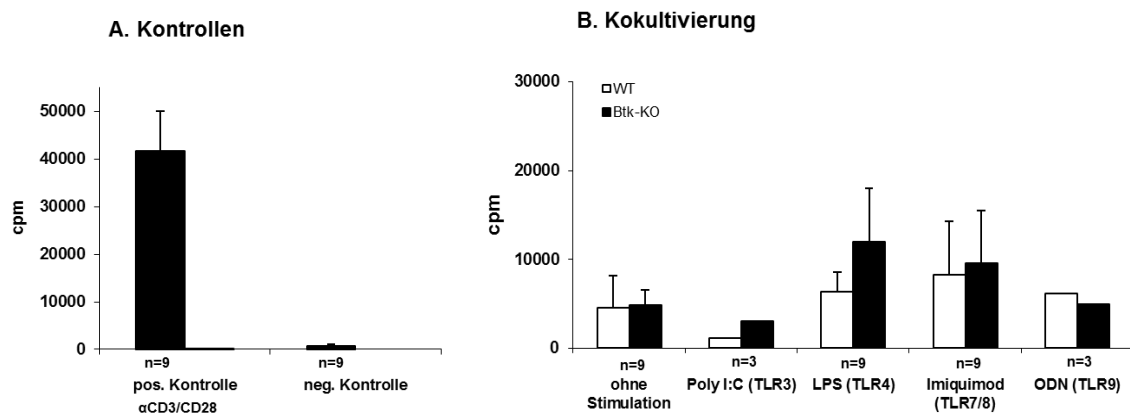
Für die Auswertung wurden die Proliferationsraten der Zellen aus folgenden Ansätzen ermittelt (siehe 2.2.10):

- *TC allein* (negative Kontrolle)
- *TC stimuliert mit  $\alpha$ CD3/CD28* (positive Kontrolle)
- *WT-DC allein* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)
- *WT-DC kokultiviert mit TC* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)
- *KO-DC allein* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)
- *KO-DC kokultiviert mit TC* (für verschiedene TLR-Stimulationsarten)

Durch die Subtraktion der Grundproliferation der DC (Ansatz *DC allein*) von dem Proliferationswert der Kokultivierung (Ansatz *DC kokultiviert mit TC*) konnte für jede Stimulationsart (*ohne Stimulation* / *Poly I:C* / *LPS* / *Imiquimod* / *ODN*) die Proliferationsrate der TC aus dem Kokultivierungsansatz ermittelt werden, nachdem diese durch die in dem Ansatz enthaltenen DC stimuliert wurden.

In die Auswertung konnten für die Stimulationsarten *Poly I:C* und *ODN* ein Einzelexperiment, sowie für die Stimulationsarten *ohne Stimulation*, *LPS* und *Imiquimod* jeweils drei Einzelexperimente miteinbezogen werden. Da jedes Experiment in Triplets angeordnet war, ergab sich eine Zahl an Einzelexperimenten von n=3 (*Poly I:C*, *ODN*) bzw. n=9 (*ohne Stimulation*, *LPS*, *Imiquimod*).

Abb. 19 zeigt das Ergebnis des Versuchs der Kokultivierung von DC und TC.



**Abb. 19: Ergebnisse der Kokultivierungsversuche dendritischer Zellen mit T-Zellen**

Für die Versuche wurden DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) nach Stimulation mit Liganden verschiedener TLR für 48 h mit TC kokultiviert und die Proliferationsrate der TC nach Stimulation durch die DC gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert (in cpm, *counts per minute*), sowie der SEM (*standard error of the mean*) der Proliferationsraten der TC in den Kontrollansätzen, sowie den Kokultivierungsansätzen mit DC. **A.** Proliferationsrate der TC in der positiven Kontrolle (nach maximaler Stimulation durch  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28) und der negativen Kontrolle (ohne Stimulation). **B.** Proliferationsrate der TC nach der Kokultivierung mit DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) ohne Stimulation, sowie nach Stimulation mit den Liganden verschiedener TLR. Mit Ausnahme der Stimulation des TLR9 durch ODN ließen die Btk-Knockout DC in allen Stimulationsarten ein tendenziell erhöhtes Potential zur Stimulation von TC erkennen, signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nicht.

$\alpha$  = Zeichen für Antikörper, Btk = Bruton-Tyrosinkinase, Btk-KO = Btk-Knockout, CD = Cluster of differentiation, cpm = counts per minute, DC = dendritische Zellen, LPS = Lipopolysaccharid, ODN = CpG-Oligodesoxynucleotid, Poly I:C = Polyinosine-polycytidylic acid, TC = T-Zelle, TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp, n = Anzahl der Einzelexperimente.

Die Auswertung der Kontrollen bestätigt eine sehr hohe Proliferationsrate der Ansätze *TC stimuliert mit  $\alpha$ CD3/CD28* (positive Kontrolle) mit einem Mittelwert von 41.485 cpm (*counts per minute*), sowie eine sehr niedrige Rate der Ansätze *TC allein* (negative Kontrolle) mit einem Mittelwert von 712 cpm.

Ein signifikanter Unterschied zwischen wildtypischen DC und Btk-Knockout DC in ihrer Fähigkeit zur Stimulation von TC konnte für keine Stimulationsart beobachtet werden. Obwohl die Ergebnisse kein ausreichendes Signifikanzniveau erreichen, lassen die TC, welche mit DC aus Btk-Knockout Mäusen kokultiviert wurden, dennoch insgesamt eine höhere Proliferationsrate erkennen, als die TC, welche mit wildtypischen DC kokultiviert wurden. Dies galt für alle TLR-Stimulationsarten, mit Ausnahme der Stimulation des TLR9 durch ODN (Signalweg MyD88-abhängig). Hier führte die Stimulation durch Btk-Knockout Zellen zu einer geringeren Proliferationsrate der TC, als die Stimulation durch wildtypische Zellen.



Mit dem Experiment der Kokultivierung sollten wildtypische und Btk-Knockout DC in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung von TC verglichen, sowie mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen TLR-Stimulationsarten untersucht werden. Es wurden dafür sowohl TLR mit MyD88-abhängigem Signalweg (TLR4, TLR7/8, TLR9), als auch TLR mit MyD88-unabhängigem Signalweg (TLR3, TLR4) stimuliert.

Die Ergebnisse der Experimente zur Kokultivierung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Btk-Knockout DC besitzen möglicherweise ein erhöhtes Potential zur Stimulation von TC.
- Diese Beobachtung konnte sowohl nach Stimulation von TLR mit MyD88-abhängigen (mit Ausnahme des TLR9), als auch nach Stimulation von TLR mit MyD88-unabhängigen Signalwegen gemacht werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Einfluss der Btk auf die Entwicklung dendritischer Zellen

Um DC für die Versuche dieser Arbeit zu generieren, wurden pluripotente Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von wildtypischen und von Btk-Knockout Mäusen gewonnen. Obwohl vorhergehende Untersuchungen aufgrund einer gesteigerter Granulopoese eine höhere Zahl an Knochenmarkszellen in Btk-defizienten Mäusen feststellen konnten [26], unterschied sich in dieser Arbeit die Zahl der Zellen, die sich aus dem Knochenmark der Mäuse isolieren ließ, zwischen den beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) nicht wesentlich. Dies könnte darin begründet sein, dass in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur erwähnten Studie eine kleinere Kohorte analysiert wurde.

Die Progenitorzellen des Knochenmarks wurden in GM-CSF-haltigen Zellmedium ausgesät und differenzierten unter dem Einfluss dieses Wachstumsfaktors nach einigen Tagen Kultivierungszeit zu myeloiden DC (siehe 2.2.5). Obwohl die Gesamtzahl an Progenitorzellen aus dem Knochenmark durch die Btk nicht wesentlich beeinflusst schien, zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Anzahl an myeloiden DC nach Kultivierung der Vorläuferzellen mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF. Die Generierungseffizienz der Btk-Knockout DC war gegenüber den wildtypischen Kontrollen signifikant verringert. Das Geschlecht der Tiere hatte auf dieses Ergebnis keinen Einfluss (siehe 3.1). Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Ergebnis vorhergehender Studien unserer Arbeitsgruppe, die ebenfalls einen Einfluss der Btk auf die Differenzierung der DC aus ihren Vorläuferzellen belegen konnten [123].

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, welche Rolle der Btk für die Entwicklung und Differenzierung der DC zukommt. Der komplexe Entwicklungsweg einer DC aus ihrer Stammzelle des Knochenmarks wird von einer Vielzahl an Faktoren beeinflusst. Ausgehend von den CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen gibt es zwei große Entwicklungslinien. Aus lymphoiden Stammzellen (CLP, *common lymphoid progenitor*) entstehen alle Zellen der lymphoiden Zellreihe, aus myeloiden Stammzellen (*common myeloid*

---

*progenitor*, CMP) alle myeloiden Zellen. Aus den CMP gehen die Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzellen (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*, MEP), sowie die Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen (*granulocyte-monocyte progenitor*, GMP) hervor. Aus den GMP schließlich entwickeln sich Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten, sowie die DC [45]. Diese Entwicklungswege werden von vielzähligen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren gesteuert. Für die myeloide Zellreihe spielen hier vor allem der Wachstumsfaktor GM-CSF, Signale über TLR [57, 78], die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$  und PU.1 [45], sowie der Zytokinrezeptor Flt3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) [54] eine Rolle. Der Einfluss der Btk, welcher dem in dieser Arbeit beobachteten verminderten Entwicklungspotential bei Btk-Knockout DC zu Grunde liegt, kann jeden Entwicklungsschritt, sowie jeden der beteiligten Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren betreffen. Es gibt jedoch bereits Untersuchungen, die auf ganz bestimmte Ursachen für diese Beobachtung hinweisen.

Im Knochenmark Btk-defizienter Mäuse konnte beispielsweise ein verminderter relativer Anteil an GMP beobachtet werden [26]. Wenn konstitutionell bereits anteilig weniger Vorläuferzellen vorliegen, aus denen DC entstehen können, so könnte dies ein Grund für das beobachtete verminderte Entwicklungspotential sein. Da jedoch die absolute Zellzahl an GMP im Knochenmark Btk-defizienter Mäuse in dieser Studie wiederum vergleichbar mit den wildtypischen Kontrollen war, ist die Konsequenz dieser unterschiedlichen Zellverteilung fraglich.

Andere Untersuchungen wiesen darüber hinaus einen reduzierten Stoffwechselumsatz in Btk-Knockout Zellen nach [123]. Auch dies könnte Ursache der verminderten Differenzierungsrate sein oder zumindest zu dieser Tatsache beitragen.

Die Grundlage für einen anderen Erklärungsansatz bietet die Beobachtung, dass in GMP aus Btk-Knockout Mäusen eine verminderte Expression der  $\alpha$ -Kette des GM-CSF Rezeptors (GM-CSFR $\alpha$ ) beobachtet werden konnte [26]. Wenn es den Btk-Knockout Zellen an intakten GM-CSF Rezeptoren fehlt, kommt es dadurch möglicherweise auch zu einer eingeschränkten Signalweiterleitung der aktivierenden Wachstumssignale durch GM-CSF an diesem Rezeptor. Dies könnte eine reduzierte Differenzierung der Zellen erklären.

---

Die Expression des Gens für GM-CSFR $\alpha$  (*Csf2ra*) wird reguliert durch die Transkriptionsfaktoren PU.1 und C/EBP $\alpha$  [42]. Eine verminderte Expression von *Csf2ra* konnte neben Btk-defizienten GMP, auch an Makrophagen nachgewiesen werden, die keine Enzymfunktion der beiden Kinasen Btk und Tec besaßen [73]. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine Interaktion der Btk und/oder Tec mit den erwähnten Transkriptionsfaktoren selbst oder den zu ihrer Aktivierung notwendigen Signalwegen sein. Ob dies aber auch der reduzierten Differenzierung der DC zu Grunde liegt, ist fraglich, denn Btk-/Tec-Knockout DC zeigten in dieser Untersuchung ein normal hohes Expressionslevel an GM-CSFR $\alpha$  [73]. Dennoch ist eine Beteiligung der Btk am Signalweg des GM-CSF Rezeptors als Ursache der verminderten Entwicklung denkbar. Darauf weisen auch Untersuchungen hin, die eine Phosphorylierung der Btk auf die Rezeptorsignale von GM-CSF bei wildtypischen neutrophilen Granulozyten belegen konnten. Auch bei diesen aus GMP entstehenden Zellen kam es durch das Fehlen der Btk zu einer verminderten Differenzierungsrate [26]. Ob sich diese Beobachtungen allerdings auch auf DC übertragen lassen, ist bisher noch unklar.

Der Transkriptionsfaktor PU.1 reguliert neben der Genexpression von GM-CSFR $\alpha$  auch die Expression einer Vielzahl weiterer Gene. In DC sind dies unter anderem die Gene der Oberflächenmoleküle CD11b [87], CD11c [66], sowie CD18 [97]. Auch die Expression von Flt3, ein für die Entwicklung der DC wesentlicher Rezeptor, wird von PU.1 beeinflusst [12]. Die besondere Relevanz von PU.1 für die Entwicklung der DC wird auch durch die Beobachtung deutlich, dass PU.1-defiziente Vorläuferzellen *in vitro* nach Gabe von GM-CSF nicht in der Lage sind, zu DC auszudifferenzieren [12]. Die Einbindung des Transkriptionsfaktors PU.1 in diese Vielfalt von Regulationsmechanismen, die für die Entwicklung der DC wesentlich sind, macht ihn für die Erklärung der beobachteten Entwicklungsreduktion interessant. Dabei könnten die Effekte der PU.1-Aktivität von einer Aktivierung der Btk abhängig sein. Hinweise darauf gibt auch die Beobachtung, dass das Fehlen von PU.1 bei Mäusen zu einer vermehrten Granulopoese zu führt [16]. Eine solche Erhöhung der Granulozytenzahl konnte sowohl in der Milz, als auch im Knochenmark von Btk-Knockout Mäusen beobachtet werden [26, 55]. Beachtenswert in diesem Zusammenhang ist auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der Expression des Ober-

---

flächenmoleküls CD18 in Btk-Knockout Mäusen, dessen Genexpression ebenfalls durch PU.1 reguliert wird [97] (siehe 3.2.4).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen in Verbindung mit vorhergehenden Beobachtungen auf einen Einfluss der Btk auf die Vorgänge der Differenzierung der DC aus ihren Vorläuferzellen des Knochenmarks hin. Wenn auch einige Anhaltspunkte bereits auf bestimmte Gründe für diese Tatsache hinweisen, sind die genauen ursächlichen Mechanismen noch unklar und bieten interessante Ausgangspunkte für weitergehende Untersuchungen. Aufschlussreich für die Beantwortung der Frage, welche Bedeutung der Btk für die Entwicklung der DC zukommt und welche Mechanismen für die verminderte Differenzierungsrate verantwortlich sind, wären beispielsweise spezifische Untersuchungen einer Interaktion der Btk mit dem Transkriptionsfaktor PU.1 oder mit anderen regulierenden Faktoren der GMP-Zelldifferenzierung. Auch eine weitere Aufschlüsselung des GM-CSF Rezeptor Signalwegs, sowie der daran beteiligten Moleküle könnte zum Verständnis einer möglichen Involvierung der Btk in diesem Signalweg beitragen.

#### **4.2 Die Bedeutung der Btk für die Chemotaxis dendritischer Zellen**

DC phagozytieren in den peripheren Geweben des Körpers pathogene und körpereigene Antigene und transportieren diese dann gebunden auf dem MHC-Komplex an Orte hoher Lymphozytendichte. Dies geschieht über eine chemotaktisch gesteuerte, lymphogene Migration, durch welche die Information einer Infektion oder Gewebsschädigung an immunkompetente Zellen weitergetragen und eine adäquate Immunantwort initiiert wird. Die Bedeutung der Btk für diese zentrale Fähigkeit der DC wurde in der vorliegenden Arbeit funktionell in Migrationsversuchen analysiert. Dafür wurde die chemotaktische Fortbewegung unstimulierter und stimulierter DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) auf die chemotaktischen Signale von MIP-3  $\beta$  und SDF-1  $\alpha$  untersucht. Darüber hinaus sollte die durchflusszytometrische Analyse der Expression der beiden Chemokinrezeptoren CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7), des CD11a:CD18-

Komplexes (LFA-1), sowie des Galectin-1 Rezeptors CD43 weitere Hinweise auf einen möglichen Einfluss der Btk auf die Migrationsfähigkeit der DC geben.

In den Migrationsversuchen zeigten die Btk-Knockout DC in allen TLR-Stimulationsarten eine geringere Migrationsaktivität als die wildtypischen Kontrollen (siehe 3.3). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen, die bereits einen Einfluss der Btk auf die MIP-3  $\beta$ - und SDF-1  $\alpha$ -vermittelte Chemotaxis von DC [55], sowie die SDF-1  $\alpha$  vermittelte Chemotaxis von B-Zellen [17] belegen konnten. Auch Btk-defiziente Mastzellen zeigten gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine geringere, antigen-vermittelte chemotaktische Migration [58]. Andere Untersuchungen konnten bei Btk-Knockout Mäusen gegenüber wildtypischen Kontrollen darüber hinaus eine reduzierte Zahl an DC im Zellpool der Milz belegen [123]. Auch diese Beobachtung unterstreicht eine möglicherweise verminderte Migrationsfähigkeit der DC, die in einem Btk-defizienten Organismus vielleicht in verminderter Zahl in die Organe des lymphatischen Systems gelangen könnten.

Welche Mechanismen der Verminderung der Chemotaxis zu Grunde liegen könnten, ist bislang unklar. Aus dem Aufbau der durchgeführten Versuche lassen sich grundsätzlich zwei mögliche Ursachen für das beobachtete Defizit in der Migrationsfähigkeit der Btk-Knockout Zellen ableiten.

Zum einen könnte das Erkennen oder die Weiterleitung der Signale der beiden Chemokine (MIP-3  $\beta$  bzw. SDF-1  $\alpha$ ) an ihren Rezeptoren (CD197 bzw. CD184) auf den DC beeinträchtigt sein. In diesem Fall wären die Btk-Knockout Zellen zwar zur Migration fähig, es würde ihnen jedoch funktionell an aktivierenden chemotaktischen Signalen mangeln. Der verminderte Anreiz zur Chemotaxis wäre so der Grund für die verminderte Migrationsaktivität. Dafür spricht, dass sich die Unterschiede zwischen Btk-Knockout DC und den wildtypischen Kontrollen in den Versuchen zumeist erst nach Zugabe der jeweiligen chemotaktisch wirkenden Stimulanzen (MIP-3  $\beta$  bzw. SDF-1  $\alpha$ ) zeigten, die ungerichtete Migration der Zellen (Chemokinese) in den Ansätzen ohne Chemokin (ohne Stimulans) zwischen den beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) dagegen meist vergleichbar hoch war. Auf die Chemotaxis der DC hatte die Enzymfunktion der

---

Btk also einen erheblichen Einfluss, während die Chemokinese der Zellen dagegen nicht wesentlich beeinflusst war.

Die durchflusszytometrische Analyse der Expression der beiden Chemokinrezeptoren CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) auf unstimulierten und auf stimulierten DC beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) zeigte eine tendenziell verminderte Expression des MIP-3  $\beta$  Rezeptors CD197 (CCR7) auf den Btk-Knockout Zellen (siehe 3.2.9). Die Expression des SDF-1  $\alpha$  Rezeptors CD184 (CXCR4) war in einer der durchgeführten Messungen dagegen bei den Btk-Knockout Zellen leicht erhöht (siehe 3.2.8). Die Migrationsaktivität der Btk-Knockout Zellen reduzierte sich in den durchgeführten Experimenten jedoch auf die Signale beider Chemokine um einen ähnlichen Prozentsatz. Die Ergebnisse der Integrinmessung sind in diesem Punkt daher eher kritisch zu bewerten und bieten keine vollständige Erklärung für die beobachtete Verminderung der Migrationsaktivität. Eine eindeutig verringerte Expression der Chemokinrezeptoren als Ursache für die bei Btk-Knockout beobachtete verringerte Chemotaxis konnte nicht festgestellt werden. Doch auch bei intakter Rezeptorexpression von CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) auf den DC könnte das Fehlen der Btk zu einer Störung der Signalweiterleitung an diesen Rezeptoren führen und die Migrationsaktivität der Btk-Knockout DC verringern.

Eine zweite mögliche Ursache für die reduzierte Chemotaxis könnte ein intrinsischer Defekt an Strukturen oder Vorgängen sein, welche die zelluläre Fortbewegung ermöglichen. In diesem Fall erhielten die Btk-Knockout DC die aktivierenden Signale der Chemokine zwar, es wäre ihnen jedoch nicht möglich, die chemotaktischen Signale an ihren Rezeptoren mit einer entsprechend gesteigerten Migrationsaktivität zu beantworten. Grundlage der zellulären Fortbewegung ist die dynamische Umgestaltung bestimmter zellulärer Proteine (Aktine). Fibrilläre Aktingerüste werden dabei durch Polymerisation in Bewegungsrichtung aufgebaut. Dies führt zu Ausbildung von Zellfortsätzen (Lamellipodien und Filopodien) und Ortsverschiebung der Zelle. Interessant in diesem Zusammenhang sind Studien, die bereits Unterschiede im Aktin-Phänotyp, sowie eine verminderte Ausbildung von Filopodien an DC aus Btk-Knockout Mäusen feststellen konnten [123]. Dies weist auf eine beeinträchtigte Organisation des Zytoskeletts als Ursache für die verminderte Migrationsfähigkeit hin. Bekräftigt

---

wird diese Vermutung auch durch Untersuchungen, die eine reduzierte Migrationsfähigkeit auf chemotaktische Signale bei Btk-defizienten Mastzellen nachweisen konnten. Ursache hierfür war eine Beeinträchtigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signalkaskade, sowie der Organisation des F-Actins aufgrund der fehlenden Enzymfunktion der Btk [58]. Darüber hinaus konnte auch in B-Zellen ein Einfluss der Btk auf die aktin-vermittelten, zytoskelettalen Strukturierungsvorgänge beobachtet werden [61, 107]. Auch die Funktion der Btk als Bindungspartner für das auf myeloide Zellen chemotaktisch wirkende HIMF-Molekül (*hypoxia induced mitogenic factor*) unterstreicht ihre Rolle für die Zellmigration [115].

Die Organisation des Zytoskeletts in DC wird von einer Vielzahl an Molekülen reguliert. Unter anderem gehören dazu die beiden GTPasen Rac und Rho, sowie PI3Ky (Phosphoinositid-3-kinase) und WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) [10, 18, 19]. Auch Vav1, ein Protein der Vav-Familie, trägt zu einer intakten Migration bei. Vav1 fungiert dabei als Guanosin-Austauschfaktor für die Moleküle Rac1, Rac2 und RhoA. Interessanterweise konnte eine Interaktion der Btk mit einem weiteren Mitglied der Vav-Familie (Vav2) [35, 107, 135], sowie mit WASP [107] in B-Zellen nachgewiesen werden. Auch in Mastzellen scheint die Btk für die Funktion von WASP Bedeutung zu besitzen [122]. Hätte die Enzymfunktion der Btk auch in den DC einen Stellenwert für die Funktion von Vav1 und WASP, so könnte dies ein Grund für den beobachteten Defekt der Migrationsfähigkeit von DC aus Btk-Knockout Mäusen sein. Diese Vermutung entkräften jedoch Studien, in denen Vav1-defiziente DC sogar eine erhöhte Migrationsaktivität zeigten [112].

Um ein tieferes Verständnis für den Einfluss der Btk auf die Migration der DC zu erhalten, wurde neben den funktionellen Versuchen zur Chemotaxis in dieser Arbeit auch die Expression des Oberflächenmoleküls CD43, sowie des CD11a:CD18-Komplexes (LFA-1) durchflusszytometrisch ermittelt. Signale von Galectin-1 an CD43 führen zu einer verstärkten Expression von Genen, die für die Zellmotilität eine Rolle spielen und die Zellmigration verstärken [30]. In allen TLR-Stimulationsarten gab es Hinweise auf eine weniger starke Expression dieses Moleküls auf den Btk-Knockout Zellen (siehe 3.2.5). CD11a:CD18 (LFA-1) ist Teil der immunologischen Synapse zwischen DC und TC, der Komplex vermittelt darüber hinaus auch die Adhäsion an und die Transmigration durch lymphatische



Endothelzellen und ermöglicht es den DC, in lymphatische Gewebe zu gelangen [98, 104]. Die durchflusszytometrische Analyse der Expression dieser Moleküle gab starke Hinweise auf eine verringerte Expression des CD11a:CD18-Komplexes (LFA-1) auf den Btk-Knockout Zellen (siehe 3.2.2 und 3.2.4).

Wenn auch die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen noch unklar sind, so wird durch die in dieser Arbeit festgestellten Beobachtungen, in Verbindung mit vorhergehenden Untersuchungen an B-Zellen und Mastzellen, sowie den Zellanalysen der Milz dennoch deutlich, dass der Btk eine bedeutende Rolle für die chemotaktische Fortbewegung zukommt. Es scheint möglich, dass die verminderte Chemotaxis, sowie die möglicherweise reduzierte Expression des Galectin-1 Rezeptors CD43 und des CD11a:CD18-Komplexes (LFA-1) eine Reduktion der Fortbewegungsfähigkeit der DC zur Folge hat. In einem Btk-defizienten Organismus hätte dies grundlegende funktionelle Folgen. Sind die DC des Körpers nicht oder nicht ausreichend in der Lage, sich in den peripheren Geweben zu verteilen, so können sie dort ihre Funktion als immunologische Wächter nicht erfüllen. Auch die Information einer Gewebsinfektion oder -schädigung würde die immunkompetenten Zellen der lymphatischen Organe nur eingeschränkt erreichen, wenn den DC die lymphogene Migration aus der Peripherie nicht möglich wäre. Ein wichtiger Pfeiler immunologischer Prozesse für die Bekämpfung von Erregern wäre dadurch limitiert. Möglicherweise ist dies Teil der Ursache der bei XLA-Patienten beobachteten Infektionsanfälligkeit.

### 4.3 Die Rolle der Btk in der Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen

Neben der Bedeutung der Btk für die Migration der DC, wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss dieses Enzyms auf die Fähigkeit der DC zur Aktivierung von TC untersucht. Dies wurde funktionell in Kokultivierungs-Assays, sowie anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung der Expression der Moleküle CD11a:CD18 (LFA-1), CD44, CD54 (ICAM-1), sowie MHC-II untersucht.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten die Btk-Knockout Zellen eine erhöhte Expression des für die Antigenpräsentation wesentlichen MHC-II Moleküls (siehe 3.2.1). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vorhergehenden Studien, die neben einer erhöhten, LPS-induzierten Expression von MHC-II auch eine gesteigerte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 bei den Btk-Knockout Zellen nachweisen konnten [53, 123]. Diese Moleküle sind Zeichen der Immunkompetenz und der Reifung der DC. Als Ursache für diese Beobachtung wurde die bei Btk-Knockout Mäusen verminderte, TLR-vermittelte Sekretion des immunsuppressiven IL-10 angesehen [53]. Unter physiologischen Bedingungen dient die durch NF- $\kappa$ B und Btk-Beteiligung vermittelte Sekretion von IL-10 der Kontrolle und Eindämmung immunologischer Reaktionen als Schutz vor Autoimmunität [82]. Die beobachtete Erhöhung der Expression der oben erwähnten immunstimulatorischen Moleküle auf Btk-Knockout DC könnte aus der reduzierten Sekretion von IL-10 resultieren und weist der Btk eine mögliche Funktion als negativer Regulator der Immunkompetenz und der Reifung der DC zu. Die kürzlich belegte Beteiligung der Btk an der durch den *hepatic growth factor* (HGF) induzierten Inhibierung der Aktivität der DC unterstreicht diese Funktion des Enzyms. Die Aktivität der Btk erwies sich dabei als unerlässlich für die HGF-induzierte Sekretion von IL-10 durch die DC [108].

Wie sich die mögliche Erhöhung kostimulierender und antigen-präsentierender Moleküle auf den Btk-Knockout DC auf die Stimulation von TC auswirken könnte, ist bislang unklar. Einige Untersuchungen konnten an Btk-Knockout DC neben der erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen auch eine gesteigerte

---

Stimulation von TC beobachten [53]. Andere Studien kamen dagegen zu dem Schluss, dass ein Fehlen der Btk-Enzymfunktion die Fähigkeit der DC zur Aktivierung von TC beeinträchtigt [55]. Analog dazu konnte auch eine verminderte Sekretion von IL-12 und IL-18 durch murine Btk-defiziente DC nach Stimulation durch LPS beobachtet werden, was wiederum zu einer verringerten Interleukin-vermittelten Produktion von IFN- $\gamma$  durch natürliche Killerzellen führte [80].

In den Kokultivierungs-Assays der DC mit TC dieser Arbeit, ergaben sich je nach TLR-Stimulationsart unterschiedliche Tendenzen (siehe 3.4). Die TC, welche von Btk-Knockout DC aktiviert wurden, zeigten eine leicht höhere Proliferationsrate nach Stimulation mit den Liganden der TLR3 (Signalweg MyD88-unabhängig), TLR4 (Signalweg MyD88 abhängig oder MyD88-unabhängig) und TLR7/8 (Signalweg MyD88-abhängig). Das Fehlen der Btk schien in diesen Fällen die Kompetenz der DC zur Stimulation von TC zu erhöhen. Nach Stimulation der DC mit dem Liganden des TLR9 (Signalweg MyD88-abhängig), zeigten die durch Btk-Knockout DC aktivierten TC dagegen eine leicht geringere Proliferationsrate. Lag keine Stimulation durch einen TLR-Liganden vor, so ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede. Bei sehr hohen Werten der Standardabweichung, müssen diese Ergebnisse jedoch eher kritisch gewichtet werden.

Es scheint aber durchaus möglich, dass DC ohne die Enzymfunktion der Btk - möglicherweise aufgrund fehlender inhibierender Signale - nach TLR-Stimulation eine höhere Kompetenz zur Stimulation von weiteren Immunzellen, insbesondere den TC, besitzen. Dafür spricht auch, dass die Expression des an der Stimulation von TC beteiligten Moleküls CD54 (ICAM-1) auf den Btk-Knockout DC in den Versuchen dieser Arbeit tendenziell erhöht war (siehe 3.2.7). Für die übrigen analysierten Moleküle CD11a:CD18 (LFA-1), sowie CD44 zeigte sich dagegen eine eher verringerte Expression auf den Btk-Knockout DC (siehe 3.2.2, 3.2.4 und 3.2.6). Anhand der Ergebnisse zur Expression von Oberflächenmolekülen lassen sich somit keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu einer möglicherweise gesteigerten oder verringerten Kompetenz der DC zur Stimulation von TC ableiten. Es muss dabei aufgrund der zum Teil geringen Zahl an Einzelmessungen - insbesondere für die Expression von CD11a -, sowie der teils von Messung zu Messung variierenden Ergebnisse, auch bedacht werden, dass sich aus den Ergebnissen dieser Versuche der vorliegenden Arbeit lediglich Tendenzen für die

Expressionsweise dieser Moleküle ableiten lassen können. Auch stehen diese Daten teils im Widerspruch zu vorhergehenden Untersuchungen zur Expressionsweise dieser Moleküle auf Btk-Knockout DC [55]. Eine weiterführende Analyse zu dieser Fragestellung wäre daher ein interessanter Ansatzpunkt.

Die Ergebnisse der Kokultivierung von DC mit TC der vorliegenden Arbeit weisen auf eine möglicherweise gesteigerte Stimulation von TC durch Btk-Knockout DC *in vitro* hin. Ob sich die Beobachtung allerdings auch auf DC *in vivo* übertragen lassen ist unklar, denn das komplexe Zusammenspiel der an einer Immunantwort beteiligten Faktoren lässt sich schwerlich auf die vereinfachten Versuchsbedingungen reduzieren. So muss beispielsweise beachtet werden, dass die Interaktion zwischen DC und TC in den Versuchen dieser Arbeit ohne die Präsentation eines Antigens, sondern nur auf Stimulation der TLR stattfand. Zwar kommt es auch in diesem Fall zur Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen DC und TC, jedoch fällt die Bindung der beiden Zellarten aneinander meist weniger stark aus. Da diese Bedingung aber für die Zellen beider Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) gleichermaßen galt, dürfte dies die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien nicht verzerren. Dennoch muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass die Versuchsdurchführung nicht den eigentlichen, MHC-II-vermittelten Aktivierungsweg *in vivo* repräsentiert.

Die Auswirkungen der möglicherweise gesteigerten Aktivierung von TC durch Btk-Knockout DC *in vivo* müssen auch vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit beleuchteten, scheinbar reduzierten Migrationsaktivität der Btk-Knockout DC betrachtet werden. Möglicherweise hätte so auch eine theoretisch gesteigerte Potenz der DC zur Aktivierung von TC *in vitro* keine funktionellen Folgen, wenn die DC in einem Btk-defizienten Organismus aufgrund eines vorhandenen Migrationsdefekts nicht effizient an die Orte einer Infektion oder in die sekundär lymphatischen Organe einwandern und auf TC treffen könnten.

---

#### 4.4 Die Beteiligung der Btk an der Signalweiterleitung der Toll-like Rezeptoren

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es, die Rolle der Btk in den Signalwegen der TLR zu beleuchten. Um dies zu untersuchen, wurden die einzelnen Versuche mit unstimulierten und mit stimulierten DC durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit den Liganden der TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS), TLR7/8 (Imiquimod), sowie TLR9 (ODN). Die Auswahl der stimulierten TLR-Liganden deckte dabei alle Möglichkeiten der MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signaltransduktion ab. Vollständig MyD88-unabhängig ist der Signalweg des TLR3. Die TLR7/8 und 9 leiten ihr Signal MyD88-abhängig weiter. Der TLR4 ist in der Lage, die Rezeptorsignale sowohl MyD88-abhängig, als auch MyD88-unabhängig zu vermitteln. Damit sollte eine mögliche Beteiligung des Enzyms an der MyD88-abhängigen und/oder MyD88-unabhängigen Signaltransduktion der TLR verdeutlicht werden.

In den durchflusszytometrischen Messungen der Oberflächenmoleküle auf den DC wiesen die Btk-Knockout DC gegenüber den wildtypischen Kontrollen für MHC-II, CD54 (ICAM-1), sowie CD184 (CXCR4) eine tendenziell erhöhte Expression dieser Oberflächenmoleküle auf, für CD11a, CD18, CD43, CD44, sowie CD197 (CCR7) dagegen eine tendenziell verminderte Expression (siehe 3.2). Da sich diese unterschiedliche Expressionsweise der Oberflächenmoleküle auf den Btk-Knockout DC jedoch zumeist für alle TLR-Stimulationsarten zeigte und es keine durchgehenden Unterschiede zwischen den einzelnen TLR-Stimulationsarten gab, scheint die Btk an den Signalwegen aller stimulierter TLR beteiligt zu sein.

In den Versuchen zur Chemotaxis zeigten die Btk-Knockout Zellen eine verminderte Migrationsaktivität auf die chemotaktischen Signale von Mib-3  $\beta$  und SDF-1  $\alpha$  (siehe 3.3). Für alle TLR-Stimulationsarten konnte eine - zumindest tendenziell - verringerte Chemotaxis beobachtet werden, was ebenso eine Beteiligung der Btk an den Signalwegen aller stimulierten TLR vermuten lässt.

Die Ergebnisse der Kokultivierungs-Assays der DC mit TC deuten auf eine möglicherweise gesteigerte Kompetenz der Btk-Knockout DC zur Aktivierung von TC hin (siehe 3.4). TC, die von Btk-Knockout DC stimuliert wurden, zeigten etwas

höhere Proliferationsraten als TC, die von wildtypischen DC stimuliert wurden. Dies galt für alle TLR-Stimulationsarten mit Ausnahme der Stimulation des TLR9 mit ODN (Signalweg MyD88-abhängig). In diesem Fall verhielten sich die Proliferationsraten der TC umgekehrt, Btk-Knockout DC stimulierten TC weniger stark als die wildtypischen Kontrollen.

Zusammenfassend gibt die Analyse der verschiedenen TLR-Stimulationsarten in den Versuchen an den DC zu Expression von Oberflächenmolekülen, Chemotaxis und Stimulation von TC keine Hinweise auf eine Beteiligung der Btk an nur bestimmten TLR Signalwegen. Denn trotz einzelner Abweichungen in Einzelexperimenten (Stimulation des TLR9 in den Kokultivierungs-Assays, siehe oben) zeigten sich die Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) in den Experimenten unabhängig davon, welcher der TLR vorher stimuliert wurde. Hinweise darauf, dass die Btk nur in ganz bestimmten TLR Signalwegen involviert ist und einige TLR Signalwege dagegen Btk-unabhängig verlaufen, gab es also nicht. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Btk sowohl an MyD88-abhängigem Signalwegen, als auch an den MyD88-unabhängigem Signalwegen der TLR beteiligt ist.

Diese Beobachtung deckt sich mit vorhergehenden Untersuchungen, die bereits eine Vielzahl an Interaktionspartner der Btk nachweisen konnten. Für die Signalwege der TLR gehören dazu MAL im Signalweg der TLR2 und 4, die TIR-Domäne der TLR6, 8 und 9, das Adaptermolekül MyD88 im Signalweg der TLR1, 2, 4, 5, 6, 7/8 und 9, sowie intrazelluläre MHC-II Moleküle und CD40 in den Signalwegen der TLR3, 4 und 9 [21, 34, 47, 63, 68]. Damit gibt es für die Signalwege aller in den Versuchen dieser Arbeit stimulierten TLR bereits Hinweise für eine Beteiligung der Btk. Diese Beobachtungen unterstreichen zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit die essentielle Funktion dieses Enzyms für eine vollständige und intakte Aktivierung sowohl der MyD88-abhängigen, als auch der MyD88-unabhängigen, TRIF-vermittelten TLR Signalwege.

---

#### 4.5 Der Stellenwert dendritischer Zellen für die Agammaglobulinämie

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichen die nicht unbedeutende Rolle der Btk für die Entwicklung und die Funktion der murinen myeloiden DC. Insbesondere der Stellenwert der Btk für Wachstum und Entwicklung, sowie für die Chemotaxis der DC wurde deutlich.

Obwohl Untersuchungen dahingehend noch ausstehen, liegt der Schluss nahe, dass sich diese an isolierten DC *in vitro* gemachten Beobachtungen auch auf die Funktion der Zellen *in vivo* übertragen lassen. Ob und inwiefern sich die Beobachtungen an den murinen Zellen auch auf die humane Form der Erkrankung, die Agammaglobulinämie, übertragen lassen, ist jedoch unsicher. Klinische Untersuchungen an XLA-Patienten weisen in diesem Punkt bisher unterschiedliche Ergebnisse vor. Es liegen einerseits klinische Daten vor, die eine verminderte Entwicklung der DC in XLA-Patienten belegen [24], andere Untersuchungen beobachteten dagegen keine Unterschiede bezüglich der Differenzierung, der phänotypischen Erscheinung oder der Fähigkeit zu Zytokinproduktion und Aktivierung von TC zwischen DC aus XLA Patienten und gesunden Kontrollen [31, 49, 110]. Weitere Studien wiesen kürzlich wiederum eine erhöhte Produktion von IL-6, TNF $\alpha$  und IL-10 durch DC aus XLA-Patienten ohne Stimulation, sowie nach Stimulation durch LPS nach [70]. Analog zu der in den Versuchen dieser Arbeit beobachteten Reduktion der Differenzierung der DC konnte ein vermindertes Kompartiment an myeloiden DC im Blut von XLA-Patienten nachgewiesen werden. Dabei waren sowohl die absolute Zellzahl, als auch der prozentuale Anteil an myeloiden DC an der Gesamtzahl der Blutleukozyten verringert [136].

In den durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit wiesen die DC der Btk-Knockout Mäuse eine erhöhte Expression des MHC-II Moleküls auf. Aus Monozyten generierte DC aus dem Blut von XLA-Patienten zeigten nach Stimulation mit dem Influenzavirus H1N1 dagegen ein gegenüber den gesunden Kontrollen vergleichbares Level an MHC-I, MHC-II und CD83, die Expression von CD86 dagegen war erniedrigt. Da auch die Level an IFN $\alpha$  und IL-12 gegenüber den gesunden Kontrollen nicht reduziert waren, lässt dies auf eine normale

Reifung und Funktion der DC aus XLA-Patienten als Reaktion auf das Influenzavirus schließen [64].

Auch bezüglich der Rolle der Btk für die Signalweiterleitung der TLR in humanen DC kamen klinische Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Beobachtungen weisen auf eine Bedeutung der Btk für die TLR2, 3, 4 und 7/8 hin. Hier hatte das Fehlen der Btk-Enzymfunktion nach Stimulation der genannten TLR eine verminderte Expression von CD83 als Marker der Zellreifung, sowie eine reduzierte Produktion von Zytokinen zur Folge, wobei die Expressionslevel dieser TLR nicht reduziert waren [120]. Andere Studien konnten hingegen eine intakte Funktion der TLR 1-6, jedoch eine reduzierte Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$  nach Stimulation des TLR8 mit ssRNA feststellen [110]. In weiteren Untersuchungen wiederum wiesen die TLR2, 3, 4, 6 und 7/8 auf DC der XLA-Patienten keine Unterschiede zu gesunden Kontrollen auf [49].

Die Studienlage zur Funktion der DC in XLA-Patienten weist insgesamt sehr variable Ergebnisse auf. Aufgrund der großen Zahl verschiedener Mutationen, die der Agammaglobulinämie zugrunde liegen können, weisen vermutlich auch die klinischen phänotypischen Erscheinungsbilder eine hohe Variabilität auf. DC aus XLA-Patienten unterliegen darüber hinaus einer sehr viel größeren genetischen Heterogenität als die der murinen Versuchstierslinien. Dies macht die Erforschung ihrer Funktion beim Menschen weitaus diffiziler und könnte den unterschiedlichen Ergebnissen der klinischen Studien zu Grunde liegen.

Die Rolle der Btk für die Entwicklung und Funktion von humanen myeloiden DC könnte anhand generierter humanisierter Mäuse untersucht werden. Immunsupprimierte Mäuse werden dafür subletal bestrahlt und nachfolgend mit humanen hämatopoetischen Stammzellen rekonstituiert. Die Stammzellen werden vorher gentechnisch dahingehend manipuliert, dass sie beispielsweise eine konstitutiv aktive oder dominant negative Mutation des Btk Gens exprimieren. Solche systematischen Analysen könnten klären, inwieweit Mutationen im humanen Btk Gen neben der Beeinträchtigung des B-Zell Kompartiments auch das myeloide System beeinflussen und somit die Pathogenese der XLA mitbestimmen.



Die in dieser Arbeit an murinen myeloiden DC erhobenen Daten bieten für diese Fragestellung sicherlich einen interessanten Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung (deutsch)

Die Bruton-Tyrosinkinase (Btk) besitzt aufgrund ihrer Beteiligung am Signalweg des B-Zell-Rezeptors eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von B-Zellen, welche ohne intakte Funktion der Btk in einem frühen Entwicklungsstadium verbleiben. Ein Verlust der Btk-Enzymfunktion führt beim Menschen zur Agammaglobulinämie (*X-linked Agammaglobulinemia*, XLA) und bei der Maus zu *Xid* (*X-linked immunodeficiency*), wobei die phänotypische Erscheinung dieser Krankheitsbilder vorrangig durch den Verlust reifer B-Zellen und einer damit verbundenen Infektionsanfälligkeit gekennzeichnet ist.

Auch der bedeutende Stellenwert der Btk für das myeloide Zellkompartiment zeichnet sich inzwischen immer deutlicher ab. Da insbesondere die dendritischen Zellen (DC) als antigen-präsentierende Zellen und Initiatoren einer adäquaten Immunantwort eine herausragende Bedeutung für die Verknüpfung von angeborener und erworbener Immunantwort spielen, wurde mit der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Btk für myeloide DC beleuchtet. Analysiert wurde der Einfluss der Btk auf Wachstum und Entwicklung der DC, die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, sowie die Fähigkeit zu Chemotaxis und Stimulation von T-Zellen (TC).

Die DC wurden aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wildtypischer und Btk-Knockout Mäuse unter dem Einfluss von GM-CSF (Granulozyten-/Makrophagenkolonie stimulierender Faktor) generiert und für die Versuche mit den Liganden der Toll-like Rezeptoren (TLR) 3 (Poly I:C), TLR4 (LPS), TLR7/8 (Imiquimod) und TLR9 (ODN) stimuliert.

Die Ergebnisse der Versuche ließen ein vermindertes GM-CSF-vermitteltes Differenzierungspotential der Btk-Knockout DC aus den Vorläuferzellen des Knochenmarks erkennen. Darüber hinaus wiesen Btk-Knockout DC gegenüber den wildtypischen Kontrollen eine tendenziell erhöhte Expression von MHC-II, CD54 (ICAM-1), sowie CD184 (CXCR4) auf. Eine tendenziell verminderte Expression durch die Btk-Knockout DC konnte für CD11a, CD18, CD43, CD44, sowie CD197 (CCR7) beobachtet werden. Btk-Knockout DC zeigten ferner eine

verminderte Chemotaxis auf die Signale von MIP-3  $\beta$  und SDF-1  $\alpha$ , sowie eine möglicherweise erhöhte Potenz zur Aktivierung von TC in Kokultivierungs-Assays.

Zusätzlich ließ sich aus der Analyse der verschiedenen TLR-Stimulationsarten ableiten, dass die Btk sowohl an den MyD88-abhängigen, als auch in den MyD88-unabhängigen TLR Signalwegen beteiligt zu sein scheint.

Die vorliegende Arbeit konnte die nicht unbedeutende Rolle der Btk für die Entwicklung und die Funktion von murinen myeloiden DC veranschaulichen, wobei insbesondere der Einfluss der Btk auf Wachstum und Entwicklung, sowie auf die Chemotaxis der DC deutlich wurde.

Diese Ergebnisse bieten sicherlich einen interessanten Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen bezüglich des Stellenwerts der DC für XLA und Xid.

## 5.2 Summary (english)

Bruton's tyrosine kinase (Btk) is mainly involved in B cell-receptor signaling and therefore plays a critical role for B cell development and function. Without Btk, B cells arrest in an early pre-B cell state. Mutations in the *Btk* gene cause XLA (*X-linked Agammaglobulinemia*) in humans and *Xid* (*X-linked immunodeficiency*) in mice, both mainly characterized by the loss of mature B cells, which leads to a severe immunodeficiency. It became evident that Btk-deficiency also affects the myeloid cell compartment. Especially, antigen presenting dendritic cells (DC) play a critical role for the function of immunity as they initiate appropriate immune responses to pathogens and link innate and adaptive immunity. Therefore, we evaluated the effect of Btk on myeloid DC with emphasis to their development, expression of surface-marker and ability to chemotaxis and T cell stimulation. Bone marrow-derived myeloid DC were generated in the presence of GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) and stimulated by the ligands of Toll-like receptor (TLR) TLR3 (Poly I:C), TLR 4 (LPS), TLR7/8 (Imiquimod) and TLR9 (ODN).

Our data indicate, that generation-efficiency of bone marrow-derived myeloid DC is impaired without Btk function. Furthermore, Btk-Knockout DC showed potentially reduced expression-levels of MHC-II, CD54 (ICAM-1) and CD184 (CXCR4), but potentially increased expression-levels of CD11a, CD18, CD43, CD44 and CD197 (CCR7). Also chemotactic migration stimulated by the signals of MIP-3  $\beta$  und SDF-1  $\alpha$  was impaired in Btk-Knockout DC. We further demonstrated that DC might show enhanced stimulation of T cells without Btk-function. Analysis of different TLR-stimulations revealed a role for Btk in MyD88-dependent as well as in MyD88-independent TLR-signaling pathways.

In summary, we provided evidence that Btk plays an important role for the development and function of myeloid DC. Especially, the impact of Btk on the generation-efficiency and chemotaxis could be demonstrated. Our results may provide a basis for further investigation to evaluate the physiological consequences of potentially impaired DC in XLA and *Xid*.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801(2006)
2. Amoras A L, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela M M: Defective Fc-, CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. *Journal of Investigational Allergology and clinical immunology*, 13: 181-188(2003)
3. Bajpai U D, Zhang K, Teutsch M, Sen R, Wortis H H: Bruton's tyrosine kinase links the B cell receptor to nuclear factor kappaB activation. *Journal of experimental medicine*, 191: 1735-1744(2000)
4. Brilot F, Strowig T, Munz C: NK cells interactions with dendritic cells shape innate and adaptive immunity. *Frontiers in bioscience*, 13: 6443-6454(2008)
5. Bromley S K, Burack W R, Johnson K G, Somersalo K, Sims T N, Sumen C, Davis M M, Shaw A S, Allen P M, Dustin M L: The immunological synapse. *Annual review of immunology*, 19: 375-396(2001)
6. Brosens L A, Tytgat K M, Morsink F H, Sinke R J, Ten Berge I J, Giardiello F M, Offerhaus G J, Keller J J: Multiple colorectal neoplasms in X-linked agammaglobulinemia. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 6: 115-119(2008)
7. Brunner C, Avots A, Kreth H W, Serfling E, Schuster V: Bruton's tyrosine kinase is activated upon CD40 stimulation in human B lymphocytes. *Immunobiology*, 206: 432-440(2002)
8. Brunner C, Muller B, Wirth T: Bruton's Tyrosine Kinase is involved in innate and adaptive immunity. *Histology and histopathology*, 20: 945-955(2005)
9. Bruton O C: Agammaglobulinemia. *Pediatrics*, 9: 722-728(1952)
10. Burns S, Thrasher A J, Blundell M P, Machesky L, Jones G E: Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*, 98: 1142-1149(2001)

11. Callahan M K, Halleck M S, Krahling S, Henderson A J, Williamson P, Schlegel R A: Phosphatidylserine expression and phagocytosis of apoptotic thymocytes during differentiation of monocytic cells. *Journal of leukocyte biology*, 74: 846-856(2003)
12. Carotta S, Dakic A, D'Amico A, Pang S H, Greig K T, Nutt S L, Wu L: The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity*, 32: 628-641(2010)
13. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh P N, Bowie A G: The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature immunology*, 7: 1074-1081(2006)
14. Corinti S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Cavani A, Angelisova P, Girolomoni G: Cross-linking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation. *Journal of immunology*, 162: 6331-6336(1999)
15. Cyster J G: Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *Journal of experimental medicine*, 189: 447-450(1999)
16. Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt S L: PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *Journal of experimental medicine*, 201: 1487-1502(2005)
17. de Gorter D J, Beuling E A, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils J M, Hendriks R W, Pals S T, Spaargaren M: Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity*, 26: 93-104(2007)
18. de Noronha S, Hardy S, Sinclair J, Blundell M P, Strid J, Schulz O, Zwirner J, Jones G E, Katz D R, Kinnon C, Thrasher A J: Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Blood*, 105: 1590-1597(2005)
19. Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, Bernasconi S, Sironi M, Santoro A, Garlanda C, Facchetti F, Wymann M P, Vecchi A, Hirsch E, Mantovani A, Sozzani S: Defective dendritic cell migration and activation of

adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO journal*, 23: 3505-3515(2004)

20. Dieu M C, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J M, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of experimental medicine*, 188: 373-386(1998)

21. Doyle S L, Jefferies C A, Feighery C, O'Neill L A: Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *Journal of biological chemistry*, 282: 36953-36960(2007)

22. Doyle S L, Jefferies C A, O'Neill L A: Bruton's tyrosine kinase is involved in p65-mediated transactivation and phosphorylation of p65 on serine 536 during NFkappaB activation by lipopolysaccharide. *Journal of biological chemistry*, 280: 23496-23501(2005)

23. Ellmeier W, Jung S, Sunshine M J, Hatam F, Xu Y, Baltimore D, Mano H, Littman D R: Severe B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members Tec and Btk. *Journal of experimental medicine*, 192: 1611-1624(2000)

24. Elluru S R, Vani J, Delignat S, Bloch M F, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine M D, Kaveri S V, Bayry J: Modulation of human dendritic cell maturation and function by natural IgG antibodies. *Autoimmunity reviews*, 7: 487-490(2008)

25. Fanales-Belasio E, Zambruno G, Cavani A, Girolomoni G: Antibodies against sialophorin (CD43) enhance the capacity of dendritic cells to cluster and activate T lymphocytes. *Journal of immunology*, 159: 2203-2211(1997)

26. Fiedler K, Sindrilaru A, Terszowski G, Kokai E, Feyerabend T B, Bullinger L, Rodewald H R, Brunner C: Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia. *Blood*, 117: 1329-1339(2011)

27. Fitzgerald K A, Rowe D C, Barnes B J, Caffrey D R, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha P M, Golenbock D T: LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and

NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of experimental medicine*, 198: 1043-1055(2003)

28. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M: CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99: 23-33(1999)

29. Fulcher J A, Chang M H, Wang S, Almazan T, Hashimi S T, Eriksson A U, Wen X, Pang M, Baum L G, Singh R R, Lee B: Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling. *Journal of biological chemistry*, 284: 26860-26870(2009)

30. Fulcher J A, Hashimi S T, Levroney E L, Pang M, Gurney K B, Baum L G, Lee B: Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. *Journal of immunology*, 177: 216-226(2006)

31. Gagliardi M C, Finocchi A, Orlandi P, Cursi L, Cancrini C, Moschese V, Miyawaki T, Rossi P: Bruton's tyrosine kinase defect in dendritic cells from X-linked agammaglobulinaemia patients does not influence their differentiation, maturation and antigen-presenting cell function. *Clinical and experimental immunology*, 133: 115-122(2003)

32. Garrigan K, Moroni-Rawson P, McMurray C, Hermans I, Abernethy N, Watson J, Ronchese F: Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. *Blood*, 88: 3508-3512(1996)

33. Gay N J, Gangloff M, Weber A N: Toll-like receptors as molecular switches. *Nature reviews. Immunology*, 6: 693-698(2006)

34. Gray P, Dunne A, Brikos C, Jefferies C A, Doyle S L, O'Neill L A: MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *Journal of biological chemistry*, 281: 10489-10495(2006)



35. Guinamard R, Fougereau M, Seckinger P: The SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase interacts with Vav, Sam68 and EWS. *Scandinavian journal of immunology*, 45: 587-595(1997)
36. Gustafsson M O, Hussain A, Mohammad D K, Mohamed A J, Nguyen V, Metalnikov P, Colwill K, Pawson T, Smith C I, Nore B F: Regulation of nucleocytoplasmic shuttling of Bruton's tyrosine kinase (Btk) through a novel SH3-dependent interaction with ankyrin repeat domain 54 (ANKRD54). *Molecular and cellular biology*, 32: 2440-2453(2012)
37. Hao S, Kurosaki T, August A: Differential regulation of NFAT and SRF by the B cell receptor via a PLCgamma-Ca(2+)-dependent pathway. *EMBO journal*, 22: 4166-4177(2003)
38. Hendriks R.W., Bredius R.G., Pike-Overzet K., Staal F.J.: Biology and novel treatment options for XLA, the most common monogenetic immunodeficiency in man. *Expert opinion on therapeutic targets*, 15: 1003-1021(2011)
39. Hermaszewski R A, Webster A D: Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Quarterly journal of medicine*, 86: 31-42(1993)
40. Hirotsu T, Yamamoto M, Kumagai Y, Uematsu S, Kawase I, Takeuchi O, Akira S: Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1 domain containing adaptor inducing IFN-beta. *Biochemical and biophysical research communications*, 328: 383-392(2005)
41. Hoebe K, Janssen E M, Kim S O, Alexopoulou L, Flavell R A, Han J, Beutler B: Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nature immunology*, 4: 1223-1229(2003)
42. Hohaus S, Petrovick M S, Voso M T, Sun Z, Zhang D E, Tenen D G: PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Molecular and cellular biology*, 15: 5830-5845(1995)

43. Howard V, Greene J M, Pahwa S, Winkelstein J A, Boyle J M, Kocak M, Conley M E: The health status and quality of life of adults with X-linked agammaglobulinemia. *Clinical immunology*, 118: 201-208(2006)

44. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman R M: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of experimental medicine*, 176: 1693-1702(1992)

45. Iwasaki H, Akashi K: Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, 26: 726-740(2007)

46. Iyer A S, Morales J L, Huang W, Ojo F, Ning G, Wills E, Baines J D, August A: Absence of Tec family kinases interleukin-2 inducible T cell kinase (Itk) and Bruton's tyrosine kinase (Btk) severely impairs Fc epsilonRI-dependent mast cell responses. *Journal of biological chemistry*, 286: 9503-9513(2011)

47. Jefferies C A, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, Walch E, Wirth T, O'Neill L A: Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *Journal of biological chemistry*, 278: 26258-26264(2003)

48. Junt T, Scandella E, Forster R, Krebs P, Krautwald S, Lipp M, Hengartner H, Ludwig B: Impact of CCR7 on priming and distribution of antiviral effector and memory CTL. *Journal of immunology*, 173: 6684-6693(2004)

49. Jyonouchi H, Geng L, Toruner G A, Vinekar K, Feng D, Fitzgerald-Bocarsly P: Monozygous twins with a microdeletion syndrome involving BTK, DDP1, and two other genes; evidence of intact dendritic cell development and TLR responses. *European journal of pediatrics*, 167: 317-321(2008)

50. Kagan J C, Medzhitov R: Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, 125: 943-955(2006)

51. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11: 115-122(1999)
52. Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11: 373-384(2010)
53. Kawakami Y, Inagaki N, Salek-Ardakani S, Kitaura J, Tanaka H, Nagao K, Kawakami Y, Xiao W, Nagai H, Croft M, Kawakami T: Regulation of dendritic cell maturation and function by Bruton's tyrosine kinase via IL-10 and Stat3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 153-158(2006)
54. Kingston D, Schmid M A, Onai N, Obata-Onai A, Baumjohann D, Manz M G: The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood*, 114: 835-843(2009)
55. Klimosch S: Die Rolle der Bruton'schen Tyrosin-Kinase im Toll-like-Rezeptor-vermittelten Signalweg von myeloiden Dendritischen Zellen. Master Thesis, Universität Ulm (2007)
56. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S: Toll-like receptor signal transduction. *Experimental and molecular medicine*, 39: 421-438(2007)
57. Krutzik S R, Tan B, Li H, Ochoa M T, Liu P T, Sharfstein S E, Graeber T G, Sieling P A, Liu Y J, Rea T H, Bloom B R, Modlin R L: TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nature medicine*, 11: 653-660(2005)
58. Kuehn H S, Radinger M, Brown J M, Ali K, Vanhaesebroeck B, Beaven M A, Metcalfe D D, Gilfillan A M: Btk-dependent Rac activation and actin rearrangement following FcepsilonRI aggregation promotes enhanced chemotactic responses of mast cells. *Journal of cell science*, 123: 2576-2585(2010)
59. Lee K G, Xu S, Kang Z H, Huo J, Huang M, Liu D, Takeuchi O, Akira S, Lam K P: Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 5791-5796(2012)

60. Lee S H, Kim T, Jeong D, Kim N, Choi Y: The tec family tyrosine kinase Btk Regulates RANKL-induced osteoclast maturation. *Journal of biological chemistry*, 283: 11526-11534(2008)
61. Liu C, Miller H, Hui KL, Grooman B, Bolland S, Upadhyaya A, Song W: A balance of Bruton's tyrosine kinase and SHIP activation regulates B cell receptor cluster formation by controlling actin remodeling. *Journal of immunology*, 187: 230-239(2011)
62. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M: Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature immunology*, 8: 578-583(2007)
63. Liu X, Zhan Z, Li D, Xu L, Ma F, Zhang P, Yao H, Cao X: Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nature immunology*, 12: 416-424(2011)
64. Liu Y, Wu Y, Lam K T, Lee P P, Tu W, Lau Y L: Dendritic and T cell response to influenza is normal in the patients with X-linked agammaglobulinemia. *Journal of clinical immunology.*, 32: 421-429(2012)
65. Liu Y J: Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*, 106: 259-262(2001)
66. Lopez-Rodriguez C, Corbi A L: PU.1 negatively regulates the CD11c integrin gene promoter through recognition of the major transcriptional start site. *European journal of immunology*, 27: 1843-1847(1997)
67. Mangla A, Khare A, Vineeth V, Panday N N, Mukhopadhyay A, Ravindran B, Bal V, George A, Rath S: Pleiotropic consequences of Bruton tyrosine kinase deficiency in myeloid lineages lead to poor inflammatory responses. *Blood*, 104: 1191-1197(2004)
68. Mansell A, Smith R, Doyle S L, Gray P, Fenner J E, Crack P J, Nicholson S E, Hilton D J, O'Neill L A, Hertzog P J: Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nature immunology*, 7: 148-155(2006)

69. Marcotte D J, Liu Y T, Arduini R M, Hession C A, Miatkowski K, Wildes C P, Cullen P F, Hong V, Hopkins B T, Mertsching E, Jenkins T J, Romanowski M J, Baker D P, Silvian L F: Structures of human Bruton's tyrosine kinase in active and inactive conformations suggest a mechanism of activation for TEC family kinases. *Protein science*, 19: 429-439(2010)

70. Marron T U, Martinez-Gallo M, Yu J E, Cunningham-Rundles C: Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. *Journal of allergy and clinical immunology*, 129: 184-90.e1-4(2012)

71. McGettrick A F, O'Neill L A: Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *British journal of haematology*, 139: 185-193(2007)

72. Medzhitov R, Janeway C A, Jr: Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296: 298-300(2002)

73. Melcher M, Unger B, Schmidt U, Rajantie I A, Alitalo K, Ellmeier W: Essential roles for the Tec family kinases Tec and Btk in M-CSF receptor signaling pathways that regulate macrophage survival. *Journal of immunology*, 180: 8048-8056(2008)

74. Mellman I, Steinman R M: Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106: 255-258(2001)

75. Mensink E J, Thompson A, Schot J D, van de Greef W M, Sandkuyl L A, Schuurman R K: Mapping of a gene for X-linked agammaglobulinemia and evidence for genetic heterogeneity. *Human genetics*, 73: 327-332(1986)

76. Mohamed A J, Yu L, Backesjo C M, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglof A, Vihinen M, Nore B F, Smith C I: Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunological reviews*, 228: 58-73(2009)

77. Mohammadzadeh I, Yeganeh M, Khaledi M, Salehiomran M: Debilitating progressive encephalitis in a patient with BTK deficiency. *Acta microbiologica et immunologica Hungaria*, 59: 335-342(2012)

78. Nagai Y, Garrett K P, Ohta S, Bahrun U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade P W: Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24: 801-812(2006)

79. Naik S H, Sathe P, Park H Y, Metcalf D, Proietto A I, Dakic A, Carotta S, O'Keeffe M, Bahlo M, Papenfuss A, Kwak J Y, Wu L, Shortman K: Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature immunology*, 8: 1217-1226(2007)

80. Ni Gabhann J, Spence S, Wynne C, Smith S, Byrne J C, Coffey B, Stacey K, Kissenpfennig A, Johnston J, Jefferies C A: Defects in acute responses to TLR4 in Btk-deficient mice result in impaired dendritic cell-induced IFN-gamma production by natural killer cells. *Clinical immunology*, 142: 373-382(2012)

81. Ochs H D, Smith C I: X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine*, 75: 287-299(1996)

82. Oh J W, Seroogy C M, Meyer E H, Akbari O, Berry G, Fathman C G, Dekruyff R H, Umetsu D T: CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *Journal of allergy and clinical immunology*, 110: 460-468(2002)

83. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Forster R: CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21: 279-288(2004)

84. Okoh M P, Vihinen M: Pleckstrin homology domains of tec family protein kinases. *Biochemical and biophysical research communications*, 265: 151-157(1999)

85. O'Neill L A, Bowie A G: The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 7: 353-364(2007)
86. Ozinsky A, Underhill D M, Fontenot J D, Hajjar A M, Smith K D, Wilson C B, Schroeder L, Aderem A: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 13766-13771(2000)
87. Pahl H L, Scheibe R J, Zhang D E, Chen H M, Galson D L, Maki R A, Tenen D G: The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *Journal of biological chemistry*, 268: 5014-5020(1993)
88. Pearl E R, Vogler L B, Okos A J, Crist W M, Lawton A R,3rd, Cooper M D: B lymphocyte precursors in human bone marrow: an analysis of normal individuals and patients with antibody-deficiency states. *Journal of immunology*, 120: 1169-1175(1978)
89. Qiu Y, Kung H J: Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene*, 19: 5651-5661(2000)
90. Randolph G J, Angeli V, Swartz M A: Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature reviews. Immunology*, 5: 617-628(2005)
91. Rawlings D J, Saffran D C, Tsukada S, Largaespada D A, Grimaldi J C, Cohen L, Mohr R N, Bazan J F, Howard M, Copeland N G: Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, 261: 358-361(1993)
92. Rawlings D J, Witte O N: Bruton's tyrosine kinase is a key regulator in B-cell development. *Immunological reviews*, 138: 105-119(1994)
93. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain R N, Sher A: In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *Journal of experimental medicine*, 186: 1819-1829(1997)

94. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl J P, Ricciardi-Castagnoli P: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, 2: 361-367(2001)
95. Rescigno M, Winzler C, Delia D, Mutini C, Lutz M, Ricciardi-Castagnoli P: Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response. *Journal of leukocyte biology*, 61: 415-421(1997)
96. Rohrer J, Parolini O, Belmont JW, Conley ME, Parolino O [corrected to Parolini O: The genomic structure of human BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics*, 40: 319-324(1994)
97. Rosmarin A G, Caprio D G, Kirsch D G, Handa H, Simkevich C P: GABP and PU.1 compete for binding, yet cooperate to increase CD18 (beta 2 leukocyte integrin) transcription. *Journal of biological chemistry*, 270: 23627-23633(1995)
98. Rouzaut A, Garasa S, Teijeira A, Gonzalez I, Martinez-Forero I, Suarez N, Larrea E, Alfaro C, Palazon A, Dubrot J, Hervas-Stubbs S, Melero I: Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN-alpha. *European journal of immunology*, 40: 3054-3063(2010)
99. Sacristan C, Tussie-Luna M I, Logan S M, Roy A L: Mechanism of Bruton's tyrosine kinase-mediated recruitment and regulation of TFII-I. *Journal of biological chemistry*, 279: 7147-7158(2004)
100. Saito K, Tolias K F, Saci A, Koon H B, Humphries L A, Scharenberg A, Rawlings D J, Kinet J P, Carpenter C L: BTK regulates PtdIns-4,5-P2 synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity*, 19: 669-678(2003)
101. Sarmiento E, Mora R, Rodriguez-Mahou M, Rodriguez-Molina J, Fernandez-Cruz E, Carbone J: [Autoimmune disease in primary antibody deficiencies]. *Allergologia et immunopathologia*, 33: 69-73(2005)
102. Satterthwaite A B, Li Z, Witte O N: Btk function in B cell development and response. *Seminars in immunology*, 10: 309-316(1998)



103. Scandella E, Fink K, Junt T, Senn B M, Lattmann E, Forster R, Hengartner H, Ludewig B: Dendritic cell-independent B cell activation during acute virus infection: a role for early CCR7-driven B-T helper cell collaboration. *Journal of immunology*, 178: 1468-1476(2007)
104. Schlichting C L, Schareck W D, Weis M: Dendritic cell adhesion is enhanced on endothelial cells preexposed to calcineurin inhibitors. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 46: 250-254(2005)
105. Schmidt N W, Thieu V T, Mann B A, Ahyi A N, Kaplan M H: Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production. *Journal of immunology*, 177: 7203-7210(2006)
106. Seong S Y, Matzinger P: Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 4: 469-478(2004)
107. Sharma S, Orlowski G, Song W: Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. *Journal of immunology*, 182: 329-339(2009)
108. Singhal E, Kumar P, Sen P: A novel role for Bruton's tyrosine kinase in hepatocyte growth factor mediated immunoregulation of dendritic cells. *Journal of biological chemistry*, 286: 32054-32063(2011)
109. Smith C I, Islam T C, Mattsson P T, Mohamed A J, Nore B F, Vihinen M: The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays*, 23: 436-446(2001)
110. Sochorova K, Horvath R, Rozkova D, Litzman J, Bartunkova J, Sediva A, Spisek R: Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood*, 109: 2553-2556(2007)
111. Spaargaren M, Beuling E A, Rurup M L, Meijer H P, Klok M D, Middendorp S, Hendriks R W, Pals S T: The B cell antigen receptor controls

integrin activity through Btk and PLCgamma2. *Journal of experimental medicine*, 198: 1539-1550(2003)

112. Spurrell D R, Luckashenak N A, Minney D C, Chaplin A, Penninger J M, Liwski R S, Clements J L, West K A: Vav1 regulates the migration and adhesion of dendritic cells. *Journal of immunology*, 183: 310-318(2009)

113. Steinman R M: The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathologie Biologie*, 51: 59-60(2003)

114. Steinman R M, Cohn Z A: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of experimental medicine*, 137: 1142-1162(1973)

115. Su Q, Zhou Y, Johns R A: Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a binding partner for hypoxia induced mitogenic factor (HIMF/FIZZ1) and mediates myeloid cell chemotaxis. *FASEB journal*, 21: 1376-1382(2007)

116. Sukumaran S, Marzan K, Shaham B, Church J: A child with x-linked agammaglobulinemia and enthesitis-related arthritis. *International journal of rheumatology*, (2011)

117. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*, 17: 1-14(2005)

118. Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140: 805-820(2010)

119. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S: Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *International immunology*, 12: 113-117(2000)

120. Taneichi H, Kanegane H, Sira M M, Futatani T, Agematsu K, Sako M, Kaneko H, Kondo N, Kaisho T, Miyawaki T: Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clinical immunology*, 126: 148-154(2008)

121. Termeer C, Averbek M, Hara H, Eibel H, Herrlich P, Sleeman J, Simon J C: Targeting dendritic cells with CD44 monoclonal antibodies selectively inhibits the proliferation of naive CD4+ T-helper cells by induction of FAS-independent T-cell apoptosis. *Immunology*, 109: 32-40(2003)
122. Torres E, Rosen M K: Protein-tyrosine kinase and GTPase signals cooperate to phosphorylate and activate Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)/neuronal WASP. *Journal of biological chemistry*, 281: 3513-3520(2006)
123. V  th M: Die Rolle der Bruton'schen Tyrosin Kinase für die Entwicklung und Funktion von dendritischen Zellen. Master Thesis, Universität Ulm (2007)
124. Vecchi A, Massimiliano L, Ramponi S, Luini W, Bernasconi S, Bonecchi R, Allavena P, Parmentier M, Mantovani A, Sozzani S: Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 66: 489-494(1999)
125. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, Hammarstrom L, Kinnon C, Levinsky R, Bobrow M: The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, 361: 226-233(1993)
126. Vihinen M, Iwata T, Kinnon C, Kwan S P, Ochs H D, Vorechovsky I, Smith C I: BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic acids research*, 24: 160-165(1996)
127. Vihinen M, Kwan S P, Lester T, Ochs H D, Resnick I, Valiaho J, Conley M E, Smith C I: Mutations of the human BTK gene coding for bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. *Human mutation*, 13: 280-285(1999)
128. Vijayan V, Baumgart-Vogt E, Naidu S, Qian G, Immenschuh S.: Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR-Dependent Heme Oxygenase-1 Gene Activation via Nrf2 in Macrophages. *Journal of immunology*, 187: 817-827(2011)
129. Vizoso Pinto M G, Rodriguez Gomez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel W H, Franz C M: Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate

the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *International journal of food microbiology*, 133: 86-93(2009)

130. Wahl L M, Shankavaram U, Zhang Y: Role of macrophages in vascular tissue remodelling. *Transplant immunology*, 5: 173-176(1997)

131. Watters T M, Kenny E F, O'Neill L A: Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunology and cell biology*, 85: 411-419(2007)

132. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301: 640-643(2003)

133. Yang E J, Yoon J H, Chung K C: Bruton's tyrosine kinase phosphorylates cAMP-responsive element-binding protein at serine 133 during neuronal differentiation in immortalized hippocampal progenitor cells. *Journal of biological chemistry*, 279: 1827-1837(2004)

134. Yao L, Janmey P, Frigeri L G, Han W, Fujita J, Kawakami Y, Apgar J R, Kawakami T: Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin. *Journal of biological chemistry*, 274: 19752-19761(1999)

135. Ying H, Li Z, Yang L, Zhang J: Syk mediates BCR- and CD40-signaling integration during B cell activation. *Immunobiology*, 216: 566-570(2011)

136. Yong P F, Workman S, Wahid F, Exley A, Webster A D, Ibrahim M A: Selective deficits in blood dendritic cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia but not specific polysaccharide antibody deficiency. *Clinical immunology*, 127: 34-42(2008)

137. Zorde-Khvaleyevsky E, Abramovitch R, Barash H, Spivak-Pohis I, Rivkin L, Rachmilewitz J, Galun E, Giladi H: Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration. *Hepatology*, 50: 198-206(2009)

138. Zorn C N, Keck S, Hendriks R W, Leitges M, Freudenberg M A, Huber M: Bruton's tyrosine kinase is dispensable for the Toll-like receptor-mediated activation of mast cells. *Cellular signalling*, 21: 79-86(2009)

---

## Anhang

### A. Abbildungen

<b>Abb. 1</b>	Dendritische Zelle	3
<b>Abb. 2</b>	Beteiligung der fünf Adaptermoleküle MAL, MyD88, SARM, TRAM und TRIF an den Signalwegen der Toll-like Rezeptoren	11
<b>Abb. 3</b>	Proteinstruktur der Btk	13
<b>Abb. 4</b>	Schematische Darstellung des BCR Signalwegs	16
<b>Abb. 5</b>	Schema eines Transwellsystems zur Ermittlung des Migrationsverhaltens der DC	37
<b>Abb. 6</b>	Anordnung des Migrationsversuches auf den Transwellplatten	38
<b>Abb. 7</b>	Versuchsanordnung der Kokultivierung von DC mit TC in der 96-Wellplatte	42
<b>Abb. 8</b>	Zellzahlen / Maus (Femur und Tibia beider Hinterläufe) der beiden Mauslinien (Wildtyp und Btk-Knockout) nach Isolation der Zellen aus dem Knochenmark, sowie nach Kultivierung mit GM-CSF für Weibchen und für Männchen	45
<b>Abb. 9</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung von CD11b und CD11c zur Kontrolle der Reinheit der Zellpopulation der myeloiden DC	47
<b>Abb. 10</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der MHC-II Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	50
<b>Abb. 11</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD11a Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	52
<b>Abb. 12</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD18 Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	54
<b>Abb. 13</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD43 Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	56

---

<b>Abb. 14</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD44 Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	58
<b>Abb. 15</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD54 (ICAM-1) Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	60
<b>Abb. 16</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD184 (CXCR4) Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	62
<b>Abb. 17</b>	Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung der CD197 (CCR7) Expression auf myeloiden dendritischen Zellen	64
<b>Abb. 18</b>	Ergebnisse der Migrationsversuche	67
<b>Abb. 19</b>	Ergebnisse der Kokultivierung dendritischer Zellen mit T-Zellen	71

## B. Tabellen

<b>Tabelle 1</b>	Toll-like Rezeptoren, ihre spezifischen Liganden (Auswahl), Pathogene, Lokalisation und Expression	8
<b>Tabelle 2</b>	Die fünf Proteindomänen der Btk und ihre Funktionen	13
<b>Tabelle 3</b>	Die zur Stimulation der DC verwendeten TLR-Liganden und Konzentrationen	33
<b>Tabelle 4</b>	Die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörperkombinationen zur Messung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf den DC	34
<b>Tabelle 5</b>	Die für die Migrationsversuche verwendeten Chemokine, deren Rezeptoren auf den DC und die verwendeten Konzentrationen	36

## Danksagung

Zum guten Schluss möchte ich hier all den Personen danken, die dazu beigetragen haben, dass ich nun tatsächlich soweit bin, diese Seite zu schreiben:

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich zuerst bei Frau Prof. Dr. Cornelia Brunner für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und das Überlassen dieses interessanten Themas. Deine freundliche, kompetente und zuverlässige Unterstützung in all den Dingen, die einem Doktoranden das Leben schwermachen können, war wirklich hilfreich für mich!

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Thomas Wirth für die Aufnahme in sein Institut, in dem die wirklich nette und kollegiale Atmosphäre ein angenehmes Arbeiten ermöglicht hat.

Ebenso ein ganz herzlicher Dank geht an Dr. Katja Fiedler, die ihr Büro und ihren Erfahrungsschatz mit mir teilte und auf jede meiner Fragen immer auch eine Antwort hatte.

Vielen Dank auch an Petra Weihrich, sowie alle anderen Mitarbeiter der „AG Brunner“ und des Instituts für Physiologische Chemie für die Unterstützung im Laboralltag und die gute Arbeitsatmosphäre.

Nur formal an letzter Stelle möchte ich meinen Eltern und meinen beiden Schwestern danken, die mir mein Studium ermöglichten und auf deren Unterstützung und Rückhalt ich immer zählen kann.

Auch allen anderen Personen, die ich nun (fast) vergessen habe und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben - vielen Dank!



## **Lebenslauf**

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.