Aus dem Forschungszentrum Borstel Leibnitz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

> Abteilung Immunologie und Zellbiologie Leitung Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus Laborgruppe Biochemische Immunologie Leitung PD Dr. Frank Petersen

# Regulation der Chemotaxis humaner T-Zellen durch das thrombozytäre Chemokin Plättchen Faktor 4

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von

Geske Woller

Lübeck, September 2007

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das menschliche Immunsystem	1
1.2	Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen	2
1.3	Chemokine	4
1.4	Plättchenfaktor 4	7
1.5	Fragestellung	9
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Zytokine und Chemokine	10
2.2	Antikörper	11
2.3	Reagenzien zur Analyse von Signaltransduktionswegen und Rezeptoren	12
<b>2.4</b> 2.4.1 2.4.2	Isolierung und Kultur von humanen Zellen Isolierung von mononuklearen Zellen (MNZ) aus peripherem Blut T-Zellblasten	<b>13</b> 13 14
2.4.2.	Auftrennung humaner MNZ in Lymhpozyten und Monozyten	14 16
2.4.3	Isolierung und Kultur von neutrophilen Granulozyten	17
<b>2.5</b> 2.5.1 2.5.2	Isolierung und Kultur von murinen T-Zellblasten Isolierung Kultur	<b>17</b> 17 18
2.6	Bestimmung von Zellzahl und Viabilität	18
2.7	Verdau von Zellen mit Chondroitinase ABC und Komplexierung von PF4 mit Chondroitinsulfat	18
<b>2.8</b> 2.8.1 2.8.2	Chemotaxis-Assay T-Zell-Chemotaxis Chemotaxis neutrophiler Granulozyten	<b>19</b> 19 20
<b>2.9</b> 2.9.1 2.9.2 2.9.3	Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen Markierung der Zellen Nachweis der PF4-Bindung auf T-Zellblasten Analyse im Durchflusszytometer	<b>21</b> 21 22 22
2.10	Immunzytochemische Färbung für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie	23
<b>2.11</b> 2.11.1 2.11.2	Bestimmung der intrazellulären Kalzium-Konzentration1Beladung der Zellen mit FURA-22Analyse der Zellen im Spektralfluorometer	<b>25</b> 25 26
<b>2.12</b> 2.12.2 2.12.2 2.12.3 2.12.3 2.12.3 2.12.4	Molekularbiologische Methoden1RNA-Isolation2Reverse Transkription und Synthese komplementärer DNA3Real-Time Polymerasekettenreaktion3.1LightCycler TaqMan-Assay3.2LightCyler SYBR Green I4Agarose-Gelelektrophorese	26 26 27 27 27 29 30

2.13	Assay zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehaltes	31
2.14	Statistik	31
3	ERGEBNISSE	33
3.1	PF4 hemmt die I-Tac-induzierte Chemotaxis	33
3.2	Charakteristika der PF4-vermittelten Inhibition der T-Zellchemotaxis	35
3.2.1	Einfluss der PF4-Konzentration auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis	35
3.2.2	Die Vorinkubation der T-Zellen mit PF4 hat keinen Einfluss auf die I-Tac vermittelte Chemotaxis	37
3.2.3	Effekt von PF4 auf die MIG und IP-10 induzierte Chemotaxis in T-Zellen	37
3.3	Untersuchungen zum PF4-Rezeptor	40
3.3.1	PF4 bindet an T-Zellblasten	40
3.3.2 3.3.3	Partielle Reduktion der PF4-Bindung durch freies CSA und nach Verdau mit Chondroitinase ABC Der inhibitorische Effekt von PF4 auf die T-Zellchemotaxis wird nicht über die Bindung	41
	an GAG-Ketten von Proteoglykanen vermittelt	43
3.3.4	Expression von CXCR3A- und B-mRNA in aktivierten T-Zellen	45
3.3.5	CXCR3B ist in T-Zellen intrazellulär exprimiert	46
3.3.6	PF4 hemmt die Chemotaxis muriner T-Zellen	48
3.4	Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des PF4-Effektes	51
3.4.1	PF4 verändert weder die Expression von CXCR3 noch moduliert es die Interaktion	
	von I-Tac mit seinem Rezeptor	51
3.4.2	Der I-Tac-induzierte intrazelluläre Anstieg der Kalziumkonzentration wird durch	
	PF4 nicht gehemmt	52
3.4.3	Beteiligung von cAMP bei der Inhibition der I-Tac-induzierte Chemotaxis	54
3.4.4	Sphingosin-1-phosphat ist nicht an der PF4-Signalweiterleitung beteiligt	57
3.4.5	Untersuchung von intrazellulären Signalmolekülen der I-Tac-vermittelte Chemotaxis	57
3.4.6	PF4 steigert die I-Tac-induzierte Menge an membranassoziiertem Ras	60
3.5	Untersuchungen zur CXCR3-unabhängigen Chemotaxis	63
3.5.1	PF4 hemmt die SDF1-α-induzierte Chemotaxis	63
3.5.2	Einfluss von PF4 auf die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten	64
4	DISKUSSION	67
5	ZUSAMMENFASSUNG	79
6	LITERATURVERZEICHNIS	81

7	ANHANG (PUFFER, MEDIEN, REAGENZIEN)	92
---	-------------------------------------	----

## Abkürzungen

А	Adenin	
Abb.	Abbildung	
AM	Azetoxymethanol	
APC	Antigen präsentierenden Zellen	
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	
Arg	Arginin	
β-TG	β-Thromboglobulin	
BCA-1	B-cell attracting chemokine-1	
bidest.	Bidestiliert	
B-Lymphozyt	Knochenmarks-(bone marrow)-Lymphozyt	
BSA	Rinderserumalbumin	
bp	Basenpaar	
bzw.	Beziehungsweise	
С	Cytosin	
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor	
CD	cluster of differentiation	
cDNA	complementary DNA	
Cho	Chondroitinase ABC	
ConA	Concanavalin A	
CSA	Chondroitinsulfat A	
CTAP-III	Bindegewebe-aktivierendes Peptid-III	
CTLL	Cytotoxic T-lymphocyte line	
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor	
db-cAMP	dibutyryl-cAMP	
db-cGMP	dibutyryl-cyclisches Guanosinmonophosphat	
dd-Adenosin	dideoxy-Adenosin	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	desoxyribonucleic acid	
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein	
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure	

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay		
ELR	Glutamin-Leucin-Arginin-Sequenzmotiv		
FACS	Fluorescence- activated cell sorter		
FCS	fötales Kälberserum (fetal calve serum)		
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor		
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin		
FURA-2	1-[2-5-Carboxyoxazol-2-yl-6-aminobenzfuran-5-oxyl]-2-amino-5'-		
	methyloxy-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure		
g	Erdbeschleunigung		
G	Guanin		
GDP	Guanindiphosphat		
Glu	Glutamat		
G-Protein	Guanidinnukleotid bindendes Protein		
GTP	Guanintriphosphat		
h	Stunden		
HBSS	Hanks gepufferte Kochsalzlösung		
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure		
HLA-DR	Humane Leukozytenantigene der Klasse DR		
HMEC-1	humane mikrovasculäre Endothelzelllinie-1		
HRP	horseradish peroxidase		
HSC	Hepatic stellate cells		
IgG	Immunglobulin G		
IFN-γ	Interferon- $\gamma$		
IL-2	Interleukin-2		
IL-4	Interleukin-4		
IL-5	Interleukin-5		
IL-8	Interleukin-8		
IL-13	Interleukin-13		
IP-10	Interferon- $\gamma$ inducible protein-10		
I-Tac	Interferon- $\gamma$ inducible T cell $\alpha$ chemoattractant		
JNK	c-Jun N-terminale Kinase		
k <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante		
kDa	Kilodalton		
KLH	Keyhole limpet hemocyanin		

LFA-1	leukocyte function-associated molecule-1		
Leu	Leucin		
LPS	Lipopolysaccharid		
Μ	Molar		
Mac-1	macrophage-1 antigen		
MAP	mitogen-activated protein		
MBS	m-Maleimidobenzoesäure-N-hydroxysuccinimid-Ester		
MCP	monocyte chemotactic protein		
MDP	membrane desalting buffer		
MEK	Mitogen-aktivierte/extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase		
Met	Methionin		
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)		
MIG	Monokine induced by INF- $\gamma$		
MIP-1	Macrophage inflammatory protein 1		
min	Minuten		
MNZ	Mononukleäre Zellen		
mRNA	messenger RNA		
n	Stichprobenumfang		
NAP-2	Neutrophile-aktivierendes Peptid 2		
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen		
р	Irrtumswahrscheinlichkeit		
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor		
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung		
PBS-D	Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco		
PCR	polymerase chain reaction		
PEST	Penicillin/ Streptomycin		
PF4	Plättchenfaktor 4		
РНА	Phytohämagglutinin		
Phe	Phenylalanin		
PI3K	Phosphatidylinisitol-3-Kinase		
PKA	Protein Kinase A		
PMN	Polymorphkernige neutrophile Leukozyten		
PTX	Pertussis Toxin		
PVP	Polyvinylpyrrolidon		

RANTES	Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted		
RNA	ribonucleic acid		
ROCK	RhoA-accociated kinase		
RP-HPLC	Umkehr-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (reversed phase-high		
	pressure liquid chromatography		
RT	Raumtemperatur		
RT-RCR	Reverse Transkriptase-PCR		
S	Sekunde		
SDF1-a	Stromal cell derived Factor1- $\alpha$		
SKI	Sphingosinkinase-Inhibitor		
SLC	Secondary lymphoid-tissue chemokine		
Т	Thymin		
TFA	Trifluoressigsäure		
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle		
T-Lymphozyt	Thymus-Lymphozyt		
TNF-α	Tumornekrosefaktor α		
TNF-β	Tumornekrosefaktor β		
U	Unit		
U/min	Umdrehungen pro Minute		
UPL	Universial Probe Library		
v/v	Volume per volume		
w/v	Weight per volume		

## 1 Einleitung

#### **1.1 Das menschliche Immunsystem**

Das Immunsystem dient dem Schutz des menschlichen Organismus vor pathogenen Mikroorganismen in seiner Umgebung, die in der Lage sind, die äußeren Barrieren des Körpers wie der Haut oder den Schleimhäuten zu überwinden.

Man unterscheidet dabei zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität. Unter der erworbenen Immunität versteht man die Reaktion antigenspezifischer Lymphozyten auf ein Antigen, welches mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses einhergeht (1). Demgegenüber steht eine Vielzahl an angeborenen Abwehrmechanismen, die einen Krankheitserreger erkennen und entsprechende Verteidigungsreaktionen auslösen. Die angeborene Immunität nimmt dabei in ihrer Abwehrleistung bei wiederholtem Kontakt mit dem Erreger nicht zu. Während zum angeborenen Immunsystem Granulozyten, Monozyten, Makrophagen aber auch Mastzellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen gehören, besteht das erworbene Immunität stehen sich aber nicht separat gegenüber, sondern sind integrative Bestandteile eines eng vernetzten Abwehrsystems.

Kommt es zu einer Infektion, werden zunächst immer die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert. Hier sind vor allem die sogenannten Phagozyten zu nennen, welche die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene darstellen. Mithilfe von Oberflächenrezeptoren sind sie in der Lage Bakterien zu binden, sie daraufhin zu phagozytieren und schließlich abzutöten. Darüber hinaus sezernieren sie eine Reihe von Botenstoffen (Zytokine und andere Mediatoren), welche die eigentliche Entzündungsreaktion auslösen. So wandern zunächst weitere neutrophile Granulozyten, und etwas verzögert, auch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen in das infizierte Gewebe ein. In Verbindung mit der Reaktion des umliegenden Gewebes kommt es zu den typischen Merkmalen einer Entzündung: calor (Wärme), dolor (Schmerz), rubor (Rötung) und tumor (Schwellung). Die bei der Entzündungsreaktion freigesetzten Zytokine und Mediatoren wirken auch auf B- und T-Zellen und können zu deren Aktivierung beitragen. B-Zellen differenzieren nach Aktivierung in Plasmazellen und sezernieren lösliche Antikörper; dies stellt die humorale Immunreaktion dar. T-Zellen sind Bestandteile der zellulären Immunität, welche sowohl die Interaktion von Immunzellen untereinander als auch mit dem Pathogen umfasst (3).

## 1.2 Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

Im gesunden Menschen findet man naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen. Als naive T-Zellen werden T-Zellen bezeichnet, die noch nicht mit ihrem Antigen in Kontakt gekommen sind, wohingegen T-Gedächtniszellen bereits wenigstens einmal durch ein spezifisches Antigen aktiviert worden sind. Bei einem erneuten Kontakt mit diesem Antigen sind Gedächtniszellen in der Lage, schneller und effizienter als naive T-Zellen ihre biologische Funktionen auszuführen.

T-Zellen, das Antigenmilieu überwachend, zirkulieren ständig zwischen Blut und den peripheren lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten, der Milz, den Tonsillen oder den Peyer'schen Plaques. Während B-Zellen in der Lage sind lösliche Antigene zu erkennen, müssen Antigene T-Zellen von anderen Zellen über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) dargeboten werden. MHC-Moleküle sind membranständige Glykoproteine, die den Immunstatus von Zellen anzeigen. Es gibt zwei Klassen von MHC Molekülen, MHC I und MHC II (4). Beide sind in der Lage Peptide zu binden und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, unterschiedlich ist jedoch das Kompartiment aus dem die Peptide stammen. MHC I-Moleküle präsentieren Peptide, die von den Proteasomen im Zytosol der Zelle gebildet werden. Neben körpereigenen werden auch Peptide von Viren oder intrazellulären Erregern auf der Zelloberfläche präsentiert, welches zur Erkennung von infizierten Zellen führt. MHC II-Moleküle präsentieren Peptide, die von internalisiertem Material aus den Phagosomen stammen. MHC I und MHC II-Moleküle sind auf unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert. Während MHC I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen unterschiedlich stark vertreten sind, werden MHC II-Moleküle nur auf professionellen Antigen präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Zu den APC zählen dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen (2).

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, auch als cytotoxische T-Zellen bezeichnet, erkennen Peptide, die über MHC Klasse I präsentiert werden und sind in der Lage, die befallenden Zellen direkt abzutöten oder in die Apoptose zu treiben.

 $CD4^+$ -T-Zellen hingegen erkennen Peptide, die über MHC Klasse II präsentiert werden. Die  $CD4^+$ -T-Zellen lassen sich durch ihre Interaktion mit B-Zellen in T<sub>H</sub>2-Zellen, sogenannte T-Helferzellen, oder durch Interaktion mit Makrophagen in T<sub>H</sub>1-Zellen, die inflammatorischen T-Zellen, unterteilen (3). Durch die Bindung des Antigens über die MHC-Moleküle und den CD3/T-Zell-Rezeptorkomplex und costimulatorischen Signalen der APC kommt es zu einer

Aktivierung der T-Zelle im lymphatischen Gewebe. Die T-Zelle beendet damit ihre Wanderung, das Volumen des Zellkerns und des Zytoplasmas werden größer und es kommt zur Sezernierung verschiedener Zytokine, unter anderem des Wachstumsfaktors IL-2. Durch einen autokrinen Mechanismus des IL-2 auf die T-Zelle kommt es innerhalb der nächsten vier bis fünf Tage zu einer enormen Vermehrung der Zellen, welche als klonale Expansion bezeichnet wird (5,6). Eine APC-unabhängige Möglichkeit der T-Zellaktivierung findet über die Stimulation des Oberflächenmoleküls CD2 statt. CD2 fungiert als Rezeptor bei der Zell-Zell-Interaktion, kann aber auch durch pflanzliche Lektine wie Phytohämagglutinin (PHA) aktiviert werden (7). PHA kann somit bei der Zellkultur *in vitro* als Stimulus zur APC-unabhängigen Aktivierung genutzt werden.

Nach der klonalen Expansion und Entwicklung in Effektorzellen verlassen die T-Zellen das Lymphorgan, kehren in den Blutstrom zurück und gelangen so zu den Infektionsherden. Die aktivierten T-Zellen besitzen nun Oberflächenmoleküle, die es ihnen ermöglichen, vom Blut in das infizierte Gewebe einzuwandern (Extravasation) (8). Diesen Vorgang kann man in vier Phasen unterteilen. Über schwache Wechselwirkungen zwischen Glykoproteinen auf der T-Zelloberfläche und Selektinen des Endothels rollen die T-Zellen am Endothel entlang (9). In der zweiten Phase kommt es durch chemotaktisch wirkende Zytokine, sogenannte Chemokine, die aus dem darunter liegenden infizierten Gewebe stammen und auf dem Endothel immobilisiert sind, zu einer Heraufregulierung von weiteren Adhäsionsmolekülen auf der T-Zelloberfläche. Aktiviertes Endothel exprimiert ebenfalls unterschiedliche Adhäsionsmoleküle, welche mit den T-Zellen interagieren und in der dritten Phase zur Ausbildung einer festen Adhärenz führen. Als letzte Phase schließt sich der als Diapedese bezeichnete Durchtritt der Zellen durch das vaskuläre Endothel in das darunterliegende Gewebe an (2). Dabei folgen die Zellen dem Konzentrationsgradienten eines oder mehrerer Chemokine, welcher sich ausgehend vom Infektionsherd im Gewebe aufgebaut hat. Diese gerichtete Migration von Zellen durch ein Gewebe wird als Chemotaxis bezeichnet.

Eine weitere Möglichkeit, wie Effektorzellen spezifisch im infizierten Gewebe ihre Funktion erfüllen können, wird von Westermann *et al.* diskutiert. In einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass Effektorzellen prinzipiell gleichmäßig in lymphatischen und nichtlymphatischen Organen verteilt vorliegen. Effektorzellen sind jedoch kurzlebig und etwa 70 % sterben innerhalb der ersten 24 Stunden in den Geweben ab. Wenn zum Beispiel bestimmte, nur im Entzündungsherd enthaltene Zytokine wie beispielsweise TNF $\beta$ -1 und IL-4 anwesend sind, überleben die Effektorzellen und üben ihre Funktion aus (10).

#### 1.3 Chemokine

Die Familie der Chemokine (Chemotaktische Zytokine) umfasst mehr als 50 Mitglieder, welche alle eine molekulare Masse zwischen 8 und 12 kDa aufweisen und in einem hohen Grad in ihrer Aminosäuresequenz und molekularen Struktur (20 -70 % Sequenzidentität) übereinstimmen. Bis auf eine Ausnahme besitzen die Chemokine vier hochkonservierte Cysteinreste, die für eine einheitliche, schleifenförmige Sekundärstruktur der Moleküle verantwortlich sind (11). Die Tertiärstruktur ist durch einen ungeordneten N-Terminus und drei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, welche von einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix durchquert werden, gekennzeichnet. Stabilisiert wird die Konformation durch Disulfidbrücken zwischen dem, vom N-Terminus ausgehend, ersten und dritten, sowie dem zweiten und viertem Cvsteinrest (12). Aufgrund der besonderen Anordnung der ersten beiden Cysteine lassen sich die Chemokine in zwei große Klassen unterteilen: die CC- und die CXC-Chemokine. Bei Vertretern der CC-Chemokinen liegen die ersten beiden Cyteinreste direkt nebeneinander, während bei den CXC-Chemokinen diese Reste durch eine beliebige Aminosäure (X) voneinander getrennt sind (Tabelle 1) (11,13,14). Ausnahmen bilden das Fraktalin (15), bei dem die Cysteinreste durch drei Aminosäuren getrennt sind und das Lymphotaktin, welches nur über zwei Cysteinreste verfügt.

Die CXC-Chemokine können in zwei Untergruppen unterteilt werden. Einige Vertreter enthalten in ihrem N-Terminus die Aminosäuresequenz Glutamat-Leucin-Arginin, welche als ELR-Motiv bezeichnet wird. Dieses Strukturmotiv ist für ihre Bindung an die gemeinsamen Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 notwendig (16). Der Gruppe der

ELR-CXC-Chemokinen wird die Gruppe der non-ELR-CXC-Chemokine gegenübergestellt (Tabelle 1), die keinen einheitlichen Rezeptor besitzt. Den etwa 50 Chemokinen stehen 17 bekannte Rezeptoren gegenüber (17). Während einige Chemokine an relativ viele verschiedene Rezeptoren binden und somit eine Reihe von Zellen aktivieren können, weisen andere einen hohen Grad an Selektivität auf. So aktiviert RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*, CCL5) über die Rezeptoren CCR1, 3, 4 und 5 Monozyten, T-Zellen, Natürliche Killerzellen, basophile Granulozyten und dendritische Zellen (11,13,14). Eotaxin (CCL11) hingegen aktiviert über den Rezeptor CCR3 selektiv basophile und eosinophile Granulozyten (18,19) sowie Mastzellen (20).

Gruppe	Struktur	ausgewählte Vertreter	
CXC ELR	-ELRÇXC-Ç-C-	IL-8, NAP-2	
CXC non ELR	-cxc-c-c-	PF4, MIG, IP-10, I-Tac	
СС	-çç_ç_c-	MIP-1α, MCP-1, RANTES	
С	-c-c-	Lymphotaktin	
CX3C	-cxxxc-c-c-	Fraktalin	

Tabelle 1:Übersicht über die Familie der Chemokine mit einigen ausgewähltenVertretern

IL-8 = Interleukin 8; NAP-2 = Neutrophile-aktivierendes Peptid 2; PF4 = Plättchenfaktor 4; MIG = Monokin induced by INF- $\gamma$ ; IP-10 = Interferon  $\gamma$  induzierbares Protein 10; I-Tac = Interferon- $\gamma$ -inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant; MIP-1 $\alpha$  = Makrophagen inflammatorisches Protein 1 $\alpha$ ; MCP-1 = Monozyten chemotaktisches Protein 1; RANTES = regulated on activation normal T-cell expressed and secreted; C = Cysteinrest; X = beliebiger Aminosäurerest; ELR = Glu-Leu-Arg-Motiv.

Die Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der heptahelikalen Rezeptoren, welche an heterotrimere GTP-bindende Moleküle vom  $G_i$ -Typ gekoppelt sind (17) und darüber das Signal ins Innere der Zelle weiterleiten. Darauf folgt als eines der ersten der nachgeschalteten Signale die Kalzium-Mobilisierung (21-24). Durch die Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, kommt es zu einem steilen Anstieg der normalerweise niedrigen cytosolischen Konzentration an freiem Ca<sup>2+</sup> (25).

Nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor wird der Ligand-Rezeptorkomplex internalisiert. Dies hat eine temporäre Verringerung der Rezeptoranzahl auf der Oberfläche zur Folge (26). Erfolgt nach kurzer Zeit eine erneute Stimulation mit dem identischen Stimulus, ist die Zelle nur zu einer stark abgeschwächten Antwort in der Lage. Ein Beispiel für diesen als Desensitivierung bezeichneten Vorgang ist die stark verminderte Induktion eines Kalziumsignals in neutrophilen Granulozyten durch Stimulation mit IL-8 (Interleukin 8) oder NAP-2 (Neutrophile-aktivierendes Peptid 2, CXCL7), nachdem sie bereits mit einem der beiden Liganden kurz zuvor in Kontakt gekommen sind (27,28). Neben der Internalisierung von Rezeptoren werden aber auch noch weitere Mechanismen diskutiert, welche zu einer

Desensitivierung der Zelle führen können.

Ein weiteres Prinzip, welches zur Schwächung der Antwort auf Chemokine führen kann, wird als Antagonismus bezeichnet. Dabei wird durch die Bindung eines Chemokins an den entsprechenden Rezeptor, welches selbst kein aktivierendes Signal auszulösen vermag, die Stimulierbarkeit des Rezeptors herabgesetzt. Ogilvie *et al.* konnten in Monozyten zeigen, dass durch die Stimulation der Zellen mit Eotaxin, welches an den CCR2 bindet aber nicht internalisiert wird, eine deutliche Hemmung der MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein 1, CCL2)-induzierten Chemotaxis stattfindet (29).

Die unterschiedlichen Subklassen der T-Zellen exprimieren jeweils eine Reihe subklassenspezifischer Chemokinrezeptoren. So exprimieren T<sub>H</sub>2- Zellen CCR3, CCR4 und CCR8 (30,31) während für T<sub>H</sub>1-Zellen CCR5 und CXCR3 charakteristisch sind (32-36). Der Umstand, dass der CXCR3 nur auf aktivierten, nicht jedoch auf ruhenden T-Zellen exprimiert wird, unterstreicht seine Bedeutung bei der selektiven Rekrutierung von aktivierten T-Zellen durch seine im entzündlichen Gewebe freigesetzten Liganden. Neben der Expression auf T-Zellen, ist die Präsenz von CXCR3 ebenfalls auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen, eosinophilen Granulozyten und Natürlichen Killerzellen beschrieben worden (35,37-40). Liganden des CXCR3 sind IP-10 (Interferon-Y-inducibleprotein 10, CXCL10), MIG (Monokine induced by INF-y, CXCL9) und I-Tac (Interferon-yinducible T cell  $\alpha$  chemoattractant, CXCL11). Gemeinsam ist den drei Liganden, dass sie nach Stimulation mit INF- $\gamma$  (Inteferon- $\gamma$ ) oder LPS (Lipopolysaccharid) aus Monozyten (41), Endothelzellen (42), bronchialen Epithelzellen (43) und neutrophilen Granulozyten (44) freigesetzt werden. Für IP-10 sind eine Reihe von Funktionen auf verschiedene Zelltypen beschrieben worden. In CD4<sup>+</sup>-T-Zellen induziert IP-10 eine Adhärenz an Endothelzellen und eine Chemotaxis, für NK-Zellen wurde ebenfalls eine chemotaktische Wirkung nachgewiesen und IP-10 steigert deren Kapazität bestimmte Tumore abzutöten. Darüber hinaus hemmt IP-10 die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen, die endotheliale Chemotaxis

und die Angiogenese (45).

Für MIG sind vergleichbare Funktionen beschrieben, die sich zum Teil nur in der unterschiedlich starken Ausprägung unterscheiden (45).

I-Tac ist der zuletzt entdeckte Vertreter der CXCR3-Liganden (22). Im Vergleich zu MIG und IP-10 besitzt es eine deutlich stärkere chemotaktische Wirkung auf CXCR3<sup>+</sup>-T-Zellen. Auch für I-Tac sind anti-tumorale Funktionen in vivo nachgewiesen worden, welche jedoch im Gegensatz zu IP-10 nicht auf einer Inhibition der Angiogenese beruhen (46). Darüber hinaus

wirkt I-Tac als natürlicher Antagonist der Rezeptoren CCR3 (47) und CCR5 (48). Lange Zeit galt der CXCR3 als einziger Rezeptor für MIG, IP-10 und I-Tac. Nach neuesten Erkenntnissen bindet I-Tac, nicht jedoch MIG oder IP-10, auch an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 159 (GPCR159, RDC1), der heute als CXCR7 bezeichnet wird (49).

IP-10, MIG und I-Tac werden insgesamt als zentrale Mitspieler bei der Rekrutierung von aktivierten T-Zellen an den Entzündungsherd angesehen, bei der sie eine entscheidende Rolle in  $T_H$ 1-vermittelten Immunantworten spielen. Dies zeigte sich unter anderem an deren Beteiligung an verschiedenen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel bei der Colitis ulcerosa (50), Multiplen Sklerose (51,52) und der Atherosklerose (53).

Vor kurzem ist auf Endothelzellen eine Spleissvariante des CXCR3 von Lasagni *et al.* beschrieben worden, die als CXCR3-B bezeichnet wird (54). IP-10, MIG und I-Tac binden an den CXCR3B, jedoch vermittelt diese Interaktion weder eine Chemotaxis noch die Mobilisierung von Kalzium. Stattdessen kommt es zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes, welche mit einer Hemmung der Proliferation der Endothelzellen einhergeht. Interessanterweise bindet CXCR3B neben IP-10, I-Tac und MIG auch das CXC-Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF4, CXCL4).

#### 1.4 Plättchenfaktor 4

Das non-ERL-CXC-Chemokin PF4 wurde 1977 erstmalig von Deuel *et al.* beschrieben (55). PF4 ist ein Protein mit einer Masse von 7800 Dalton, das sich in Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert zu einem Tetramer aus identischen, nicht kovalent gebundenen Molekülen zusammenlagert (56,57). Es wird in Megakaryozyten synthetisiert und in den  $\alpha$ -Granula humaner Thrombozyten gespeichert. Nach der Aktivierung der Thrombozyten wird es innerhalb von Sekunden bis Minuten freigesetzt (58,59). Während im Plasma nur Spuren von PF4 nachweisbar sind (< 1nM), werden im Serum gesunder Menschen Werte zwischen 0,9 bis 1,9 µM erreicht (58). Es ist jedoch davon auszugehen, dass es bei der Aggregation von Thrombozyten lokal zu weit höheren Konzentrationen kommen kann.

Für die Zellaktivierung durch PF4 stehen mindestens zwei verschiedene Rezeptoren zur Verfügung, die beide auffällige Unterschiede zu den typischen Chemokinrezeptoren aufweisen. Neben dem bereits oben erwähnten CXCR3B, welcher vermutlich über

GTP-bindende Proteine des  $G_s$ -Types Signale weiterleitet, konnten Petersen *et al.* auf neutrophilen Granulozyten die spezifische Interaktion des Chemokins mit einem Proteoglykan der Chondroitinsulfat-Klasse nachweisen (60). Interessanterweise sind diese

Moleküle auch an der Bindung von PF4 an T-Zellen beteiligt. Fleischer *et al.* konnten zeigen, dass nach Behandlung von T-Zellen mit dem Enzym Chondroitinase ABC, welches Chondroitinsulfate auf der Zelloberfläche abbaut, die PF4-Bindungskapazität dieser Zellen deutlich vermindert ist (61).

PF4 besitzt ein für Chemokine ungewöhnlich pleiotropes und heterogenes Wirkspektrum.

Es konnte gezeigt werden, dass PF4 in NK-Zellen eine IL-8 Produktion (62), in basophilen Granulozyten die Freisetzung von Histamin (63) und in eosinophilen Granulozyten Adhärenz (64) induziert. In neutrophilen Granulozyten vermittelt PF4 eine starke Adhärenz an Endothelzellen (65) sowie die selektive Exozytose von Inhalten der spezifischen Granula (66). Für Monozyten wurde gezeigt, dass PF4 zur Generierung von Sauerstoffradikalen führt (67) und eine feste Adhärenz induziert, die mit der Freisetzung großer Mengen an TNF- $\alpha$ einhergeht (68). Im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Chemokinfamilie induziert PF4 trotz seiner vielfältigen Effekte keine Chemotaxis (16,69-71). Interessanterweise konnte für PF4 auch die Beteiligung an, für Chemokine untypischen, langfristigen Regulationsprozessen nachgewiesen werden. So inhibiert PF4 die Megakaryogenese (72), die Angiogenese (73) und das Wachstum von leukämischen Zellen (63). Darüber hinaus induziert PF4 die Differenzierung von Monozyten in einen bestimmten Subtyp von Makrophagen, der durch eine Phagozytoseleistung und sehr geringe Expression erhöhte des Oberflächenmoleküls HLA-DR gekennzeichnet ist (67,68).

Für T-Zellen konnte in unserer Arbeitsgruppe eine inhibitorische Wirkung von PF4 auf langfristige Zellfunktionen nachgewiesen werden. So hemmt PF4 die Ausschüttung von

IFN- $\gamma$  und IL-2 und die Proliferation der Zellen nach antigener oder polyklonaler Stimulation (61). Ergänzend zu diesen Befunden konnten Liu *et al.* zeigen, dass die Hauptpopulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen, die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen, durch PF4 in ihrer Proliferation gehemmt werden, wohingegen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen (regulatorische T-Zellen) eine gesteigerte Proliferation zeigen (74). Bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen wurde darüber hinaus bestätigt, dass PF4 die Freisetzung von IL-2 und IFN- $\gamma$  hemmt. Bei den zusätzlich untersuchten Zytokinen

IL-4,-5,-10 und TNF-α wirkt PF4 ebenfalls inhibitorisch auf deren Freisetzung. Romagnani dagegen berichtet von einer Aufregulation der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 durch PF4 sowohl in SK-( $T_H$ 1-ähnlichen) oder Der p1-spezischen ( $T_H$ 2-ähnlichen) CD4<sup>+</sup>-T-Zelllinien als auch in polyklonalaktivierten naiven T-Zellen (75). IFN-γ unterliegt auch in diesen Zellpopulationen einer negativen Regulation durch PF4. Da in den T<sub>H</sub>2-ähnlichen Zellen nach PF4-Gabe ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration beobachtet wurde, vermuten die Autoren eine Beteiligung von CXCR3B an diesem Prozess.

## 1.5 Fragestellung

Bisher wurden in meiner Arbeitsgruppe Effekte von PF4 auf eher langfristige Immunantworten von T-Zellen nachgewiesen (61).Hierbei werden die Zytokinfreisetzung und die Proliferation von naiven T-Zellen nach deren Stimulation gehemmt. In meiner Arbeit sollte nun untersucht werden, ob und inwieweit PF4 auch schnelle Immunantworten von

T-Zellen beeinflussen kann. Die Wanderung entlang eines Konzentrationsgradienten eines chemotaktischen Stimulus stellt einen bedeutsamen Schritt bei der Rekrutierung von Immunzellen dar. Obwohl eine große Anzahl von Chemotaxinen bekannt ist, ist die Regulation der chemotaktischen Antwort weitgehend ungeklärt.

Aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind in der Lage andere Immunzellen zu aktivieren und die Immunantwort in eine bestimmte Richtung zu lenken. Sie stellen somit eine bedeutsame Population bei der erworbenen Immunantwort dar und ihre korrekte Anwesenheit am Infektionsherd muss gewährleistet sein. Dabei spielt das Zytokinmilieu eine entscheidende Rolle.

Ziel meiner Arbeit war, den Einfluss von PF4 auf die Chemotaxis von aktivierten T-Zellen zu untersuchen. Dabei standen folgende Aspekte im Mittelpunkt meiner Arbeit:

- 1. Identifikation von potentiellen modulatorischen Effekten von PF4 auf die CXCR3vermittelte Chemotaxis humaner T-Zellen.
- 2. Charakterisierung dieses modulatorischen Effekts hinsichtlich seiner Spezifität für bestimmte Zelltypen und Stimuli.
- 3. Aufklärung der dieser Modulation zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen hinsichtlich der daran beteiligten Rezeptoren und der durch diese vermittelten intrazellulären Signale.

## 2 Material und Methoden

#### 2.1 Zytokine und Chemokine

Die rekombinanten humanen Chemokine I-Tac, IP-10, MIG und SDF1-alpha und das rekombinante murine Chemokin I-Tac stammten von der Firma PeproTech (Rocky Hill, N.J., USA) und wurden vor Gebrauch in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) zu einer Konzentration von 0,5mg/ml gelöst und bei -20°C gelagert. PeproTech lieferte ebenfalls rekombinantes Interleukin-2 (IL-2). Laut Hersteller beträgt die an CTLL (*Cytotoxic T-lymphocyte line*)-2-Zellen bestimmte spezifische Aktivität mindestens 1 x10<sup>7</sup> U/mg. Die Lagerung erfolgte bei - 20°C in 100 nM Essigsäure in einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Das Lektin PHA wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen) und das Lektin Concanavalin A (ConA) von der Firma GE Healthcare (Freiburg) bezogen.

Humanes natives PF4 wurde in der Arbeitsgruppe Biologische Chemie (Forschungszentrum Borstel) aus Überständen thrombinstimulierter Thrombozyten in einer dreistufigen Prozedur aufgereinigt und mir zur Verfügung gestellt. Hierbei wurde zunächst das in den Proben enthaltene  $\beta$ -TG durch Immunaffinitätschromatographie entfernt (76). Der aufgefangene Durchlauf wurde mit Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 0,1 % versetzt und das PF4 durch Immunaffinitätschromatographie über immobilisierten monoklonalen anti-PF4-Antikörper (Klon PF63.1) aufgereinigt (68). Das bei pH 2,5 eluierte Material wurde schließlich Umkehr-Hochdruckflüssigkeitschromatographie durch (RP-HPLC) zur Homogenität aufgereinigt (66). Humanes NAP-2 wurde aus CTAP-III durch limitierte Spaltung mittels Chymotrypsin gewonnen. Dazu wurde CTAP-III aus den β-TG-Präparationen mittels RP-HPLC gereinigt und je 1mg CTAP-III in PBS für 30 min bei 37°C mit 13 µg bovinen Pankreas Chymotrypsin (87 U/mg, Serva, Heidelberg) verdaut. Das gebildete NAP-2 wurde anschließend über RP-HPLC bis zur Homogenität aufgereinigt (77). Nach der Präparation wurden die Chemokine in Anwesenheit von 0,1 %iger Trifluoressigsäure (TFA) lyophilisiert und bei -70°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die thrombozytären Chemokine wieder in 0,1% iger TFA zu Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 mg/ml gelöst bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Antikörper

2.2

Ein muriner monoklonaler Antikörper der Subklasse IgG<sub>1</sub> gegen den humanen CXCR3 (Klon 49801), ein PE-konjugierter monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen den murinen CXCR3 (Klon 220803, Subklasse  $IgG_{2A}$ ) sowie eine korrespondierende Isotypkontrolle (RatteIgG<sub>2a</sub>-Pe-konjugiert; Klon 54447) stammten von der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden). Der monoklonale Antikörper Maus-anti-Human CD3 (Klon UCHT1) sowie ein irrelevanter Antikörper des gleichen Isotypes (MausIgG<sub>1</sub>; Klon DAK-Go1) wurden bei der Firma Dako (Hamburg) erworben. Von der Firma Santa Cruz (Heidelberg) stammte der monoklonale Antikörper Maus-anti-Human Ras (Klon SC-32) und der irrelevante Antikörper des gleichen Isotyps (MausIgG<sub>2B</sub>; Klon DAK-Go9) von der Firma Dako. Die Antikörper Maus-anti-Human β-TG (Klon C24) und Maus-anti-Human PF4 (Klon PF63.1) wurden in der Laborgruppe Biologische Chemie (Forschungszentrum Borstel) generiert (68,76) und zur Verfügung gestellt. Ein monoklonaler Antikörper gegen CXCR3B (Klon BI-1) wurde in der Laborgruppe Biochemische Immunologie (Forschungszentrum Borstel) generiert und mir zur Verfügung gestellt. Dabei führte Frau C. Hass die Immunisierung der Mäuse, die Fusion der Hybridomzellen sowie die Klonierung der positiven Hybridome durch. Das Prinzip der Verfahrensweise ist hier in verkürzter Form wiedergegeben: Ein synthetisches Peptid, das die Aminosäuresequenz des CXCR3B von Position 1 bis 25 (CXCR3B [1-25]) umfasste, wurde von R. Bartels aus der Laborgruppe Strukturbiochemie des Forschungszentrums Borstel hergestellt. Um die Immunogenität des Peptides zu steigern, wurde es chemisch mit MBS (m-Maleimidobenzoesäure-N-hydroxysuccinimid-Ester) an KLH (Keyhole limpet hemocyanin) als Trägermolekül gekoppelt. Die Immunisierung von Mäusen des Inzuchtstammes BALB/c erfolgte viermal im Abstand von vier Wochen mit 100 µg des Peptidkonjugates bei der ersten bzw. 50 µg für alle weiteren Injektionen in Gegenwart von komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA). Nach weiteren 10 Wochen wurde eine Auffrischung mit Peptidkonjugat (50 µg) in komplettem Freund'schen Adjuvans (IFA) vorgenommen, auf die in einem Abstand von jeweils einem Tag noch drei weitere Injektionen (wie oben, jedoch ohne IFA) folgten. Einen Tag nach der letzten Injektion erfolgte die Entnahme der Milz und die Fusion der enthaltenen Maus-B-Lymphoblasten mit Myelomzellen der Zelllinie X 63-Ag8. Die aus der Fusion hervorgegangenen kultivierten Hybridomzellen wurden nachfolgend mit einem ELISA

auf die Sekretion von spezifischen Antikörpern gegen das Peptid CXCR3B [1-25] mithilfe des an BSA-konjugiertem Peptides CXCR3B [1-25] überprüft. Hybridomzellkulturüberstände, welche im ELISA positiv reagierten, wurden anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung von Lymphozyten auf ihre Reaktivität mit dem nativen Rezeptor überprüft (siehe Abschnitt 2.9). Diejenigen Hybridomzellen, welche Antikörper gegen natives CXCR3B gebildet hatten, wurden anschließend dreimal subkloniert, um eine monoklonale, antikörperproduzierende Zelllinie zu erhalten. Der Isotyp der monoklonalen Antikörper wurde mithilfe des Kits IsoStrip der Firma Roche (Mannheim) ermittelt. Alle Antikörper gehören, wenn nicht anders vermerkt, dem Isotyp IgG<sub>1</sub> an. Das Ziege-anti-Maus DTAF-konjugierte polyklonale Antiserum (IgG) wurde von Dianova (Hamburg) und das Ziege-anti-Maus Alexa488-konjugierte polyklonale Antiserum (IgG) von Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

## 2.3 Reagenzien zur Analyse von Signaltransduktionswegen und Rezeptoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren verschiedener Elemente der Signaltransduktion (Tabelle 1) wurden nach Herstellerangaben in Aqua dest. oder Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma) gelöst und bei 4° C oder -20° C gelagert.

Tabelle 1:	Verwendete	Inhibitoren
------------	------------	-------------

Inhibitor	Zielmolekül	Eingesetzte	Lösungsmittel	Firma
		Konzentration		
JNK-Inhibitor II	JNK 1,2,3	5 μΜ	DMSO	Calbiochem
				(Darmstadt)
PP2	Src (Hck)	25 μΜ	DMSO	Calbiochem
PD098059	МЕК	40 µM	DMSO	Calbiochem
SB203580	p38	25 μΜ	DMSO	Calbiochem
SU6656	Src (Lyn)	5 μΜ	DMSO	Calbiochem
Y-27632	ROCK	5 μΜ	Aqua dest.	Calbiochem
Ro-20-1724	Phosphodiesterase	10 µM	DMSO	Calbiochem
KT-5720	Proteinkinase A	1 µM	DMSO	Biomol
				(Hamburg)
Dideoxyadenosin	Adenylatcyclase	500 µM	DMSO	Biomol
Manumycin A	Ras-	1,875-15 μM	DMSO	Sigma
	Farnesyltransferase			
Wortmannin	PI3-Kinase	10 nM	DMSO	Alexis Corp.
				(Lausen,
				Schweiz)
Sphingosinkinase-	Sphingosinkinase	10 µM	DMSO	Calbiochem
Inhibitor (SKI)				

Die Substanzen Forskolin und Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) und -cGMP (db-cGMP) stammten von Calbiochem.

## 2.4 Isolierung und Kultur von humanen Zellen

## 2.4.1 Isolierung von mononuklearen Zellen (MNZ) aus peripherem Blut

Humane MNZ wurden aus venösem Blut gesunder Einzelspender durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Hierzu wurde das Vollblut zunächst im Verhältnis 5:1 mit 3,8 %iger Natriumzitratlösung (siehe Anhang) verdünnt und dann mit 3/8 des

14

Volumens warmer PBS-D-Lösung (siehe Anhang) versetzt. Jeweils 30 ml des verdünnten Blutes wurden mit 10 ml Pancoll (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) unterschichtet und bei 450 xg für 42 min bei RT zentrifugiert. Nach Entfernung der zu oberst liegenden Plasmaschicht wurden die in der oberen Phase des Pancolls angereicherten mononuklearen Zellen (MNZ) abgenommen. Um eine Voraktivierung der Zellen zu verhindern, wurden alle folgenden Schritte bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Die MNZ wurden in 50 ml Polypropylenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt, ad 50 ml mit eiskaltem PBS-D aufgefüllt und bei 500 xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte ein zweiter Waschschritt bei 370 xg für 10 min bei 4°C. Die erhaltende Zellzahl wurde nach Resuspension in 50 ml Elutriationsmedium (siehe Anhang) durch Entnahme von 5µl Zellsuspension und Mischen in 5 ml isotonischer Fertiglösung (CASY®ton) in einem Zellzählgerät (CASY TT, Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Grundlage dieser Messung bildet hierbei eine Widerstandsmessung. Die zu zählenden Zellen werden mit konstanter Geschwindigkeit durch eine elektrolytgefüllte Präzisionsmesspore gesaugt, welche einen definierten Widerstand darstellt. Mit dem Eintritt der Zellen in die Messpore verdrängen diese eine ihrem Volumen entsprechenden Menge an Elektrolytlösung. Demzufolge ändert sich der Widerstand, wobei intakte Zellen als Isolator wirken und somit zu einer Erhöhung des Widerstandes in der Messpore führen. Im Gegensatz dazu werden tote Zellen anhand der Größe des Zellkernes bestimmt, da keine intakte Membran mehr vorhanden ist. Mit dieser Art der Zellzählung ist demzufolge eine exakte Trennung unterschiedlicher Zellpopulationen sowie eine klare Abtrennung von lebenden und toten Zellen möglich.

#### 2.4.2 T-Zellblasten

#### 2.4.2.1 Auftrennung humaner MNZ in Lymhpozyten und Monozyten

Die weitere Auftrennung der MNZ in einzelne Zellfraktionen erfolgte mithilfe der Gegenstromelutriation. Hierzu wurde ein Beckman-Elutriationssystem, bestehend aus einer Zentrifuge vom Typ J2-21 und einem Elutriationsrotor des Typs JE-6B (*Beckman*, München), verwendet. Entsprechend einer von Grage-Griebenow *et al.* (78) beschriebenen Methode wurden die Zellen mithilfe einer peristaltischen Pumpe (Typ Thomafluid E-25, *Reichelt Chemietechnik GmbH*, Heidelberg) bei einer Flussrate von 26,4 ml/min in die Kammer des sich drehenden Elutriationsrotors (3500 U/min, 12°C) eingeladen. Nach der Beladung wurde die Durchflussrate schrittweise erhöht, um die einzelnen Zellfraktionen gemäß ihres

Sedimentationskoeffizienten zu eluieren. Die genauen Flussraten, bei denen die einzelnen Zelltypen den Rotor verlassen, sind experimentell ermittelt worden und in Tabelle 2 zusammengefasst. Die in den weiteren Experimenten verwendeten Lymphozyten wurden bei 33,2 ml/min gewonnen. Die Bestimmung von Anzahl und Reinheit der Zellen erfolgte wie für die MNZ in oben beschriebener Weise. Die Reinheit der Lymphozyten betrug in allen Experimenten mehr als 90 %.

Nach der Elutriation wurden die Lymphozyten in Kulturmedium (siehe Anhang) aufgenommen und bei 300 xg für 10 min bei RT zentrifugiert.

Flussrate ml/min	Fraktionsvolumen (ml)	Fraktion
26,4	200	Einladen der Zellen
28,8	50	Spülschritt
30,4	50	Spülschritt
32	300	kleine Lymphozyten
32,8	50	Spülschritt (Lymphozyten)
33,6	50	Spülschritt (Lymphozyten)
34,4	50	Spülschritt (Lymphozyten)
35,2	50	Spülschritt (Lymphozyten)
36	200	große Lymphozyten
36,8	150	Spülschritt
		(Reste Lymphozyten)
37,6	150	Spülschritt
38,4	150	Spülschritt
39,2	50	Beginn der Monozyten
Zentrifugenstopp-40	50	Monozyten

## Tabelle 2: Protokoll zur Elutriation von Lymphozyten

## 2.4.2.2 Generierung von T-Zellblasten

Isolierte MNZ oder Lymphozyten wurden in einer Konzentration von 2 x10<sup>6</sup> Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen und in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät. Zur polyklonalen Aktivierung der T-Lymphozyten wurde PHA (5  $\mu$ g/ml) zum Kulturmedium hinzugefügt. Nach drei Tagen wurde das Medium gewechselt und die T-Lymphozyten mit IL-2 (100 U/ml) stimuliert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen mit frischem, IL-2-haltigem Medium versorgt. Die Kultur der Lymphozyten erfolgte für sechs bis zehn Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank.

T-Zellblasten, die aus Parallelkulturen von MNZ und Lymphozyten der gleichen Spender generiert wurden, zeigten keine Unterschiede in Zellzahl, CD3- und CXCR3-Expression und

wurden daher gleichermaßen verwendet.

#### 2.4.3 Isolierung und Kultur von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender durch eine Kombination aus Sedimentation und Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (79). Humanes Vollblut wurde mit 3,8 %iger Natriumzitratlösung im Verhältnis 5:1 versetzt und dann mit 3/8 des Volumens warmer PBS-D-Lösung versetzt. Die Suspension wurde 1:3 mit Plasmasteril (*Fresenius Kabi Deutschland GmbH*, Bad Homburg) verdünnt in einen 50 ml-Standzylinder überführt. Nach 30-45 min Sedimentation wurde der erythrozytenarme Überstand abgenommen, vorsichtig auf eine Pancoll-Lösung geschichtet und bei 850 xg für 20 min bei Raumtemperatur (Anlauf 3 min, ohne Bremse) zentrifugiert. Um restliche Erythrozyten zu entfernen, wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem Aqua dest. resuspendiert und nach 45 s durch die Zugabe eines gleichen Volumens an zweifach konzentriertem PBS-D wieder auf die physiologische Salzkonzentration eingestellt. Nach Zentrifugation (300 xg,

10 min, RT, Bremse 3) wurden die neutrophilen Granulozyten, je nach Versuchsansatz in unterschiedlichen Puffern in einer Dichte von 2  $\times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen. In einigen Ansätzen wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und für 20-22 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank kultiviert.

#### 2.5 Isolierung und Kultur von murinen T-Zellblasten

#### 2.5.1 Isolierung

Weiblichen Mäusen (Stamm C57/BL6, Wildtyp) wurde in der Laborgruppe Molekulare Infektiologie am Forschungszentrum Borstel die Milz entnommen und diese mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur Zellvereinzelung wurden die präparierten Milzen mithilfe eines Spritzenstempels durch Gaze (Maschenweite 125  $\mu$ m) homogenisiert und in Kulturmedium resuspendiert. Nach Zentrifugation (300 xg, 5 min, RT, Bremse 3) wurde das Zellpellet in 2,5 ml Erythrozyten-Lysepuffer (siehe Anhang) resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurde die Erythrozytenlyse gestoppt. Nach Zentrifugation (300 xg, 5 min, RT, Bremse 3) wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

## 2.5.2 Kultur

Splenozyten wurden in einer Konzentration von 2  $x10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen und für zwei Tage mit Concanavalin A (1 µg/ml) stimuliert. Zur Abtrennung von toten Zellen wurden 10 ml Pancoll mit maximal 40 ml Zellsuspension überschichtet. Nach Zentrifugation (850 xg, 20 min, RT, Anlauf 3 min, ohne Bremse) wurde die zu oberst liegende Mediumschicht entfernt und die in der oberen Phase des Pancolls angereicherten lebenden Zellen abgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (300 xg, 10 min, RT) wurden die Zellen zu 2  $x10^6$ /ml in Kulturmedium aufgenommen und es erfolgte die Restimulation mit IL-2 (100 U/ml) für fünf Tage, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde. Lag die Viabilität der T-Zellblasten an Tag sieben unterhalb von 50 %, wurden die toten Zellen erneut mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt.

#### 2.6 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Die Anzahl der viablen Zellen wurde unter Verwendung von 0,1%iger Trypanblau-Lösung (siehe Anhang) bestimmt. Intakte Zellmembranen sind für diesen Farbstoff inpermeabel, so dass nur tote und stark geschädigte Zellen angefärbt werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde entweder 1:10 oder 1:20 mit Trypan-Lösung verdünnt und die Anzahl der viablen und toten Zellen in einer Neubauer Zählkammer (Brand, Ludwigshafen) lichtmikroskopisch bestimmt.

## 2.7 Verdau von Zellen mit Chondroitinase ABC und Komplexierung von PF4 mit Chondroitinsulfat

In einigen Versuchsansätzen wurden T-Zellen mit dem Enzym Chondroitinase ABC (Sigma) behandelt. Nach Zentrifugation (188 xg, 15 min, RT) wurden die Zellen mit 2 x10<sup>6</sup>/ml in Cl-Medium (siehe Anhang) aufgenommen und für 30 min mit 1 U/ml bei 37°C inkubiert und nachfolgend sowohl in der Chemotaxis als auch in der Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Des Weiteren wurde in einigen Ansätzen PF4 (4  $\mu$ M) mit 20  $\mu$ g/ml Chondroitinsulfat A (Sigma) für 30 min bei 37°C komplexiert. Die PF4/Chondroitinsulfat-Komplexe wurden anschließend im Chemotaxis-Assay und in der Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt.

#### 2.8 Chemotaxis-Assay

Chemokine besitzen die Fähigkeit in Zellen eine gerichtete Wanderung entlang eines Konzentrationsgradienten (Chemotaxis) zu induzieren. In dem Chemotaxis-Assay nach Boyden (80) wird diese Zellwanderung gemessen, indem man ein Reaktionsgefäß durch eine permeable Membran in zwei Kammern trennt. In die untere Kammer wird der chemotaktische Stimulus und in die obere die Zellsuspension gegeben. Zwischen den Kammern bildet sich ein chemotaktischer Gradient aus, aufgrund dessen die Zellen durch die Membran wandern. Die Anzahl, der innerhalb einer bestimmten Zeit in die untere Kammer gewanderten Zellen, ist das Maß für die chemotaktische Aktivität einer Substanz.

#### 2.8.1 T-Zell-Chemotaxis

Der Chemotaxis-Assay wurde in einer 48-well-Kammer der Firma NeuroProbe (Gaithersburg, MD, USA) nach einer Methode von Ludwig *et al.* (81) durchgeführt. Die obere und untere Komponente des Systems werden durch eine mit 5 µm großen Poren versehene PVP-freie Polycarbonatmembran (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) getrennt, wobei beide Seiten unterschiedliche Oberflächeneigenschaften besitzen. Die Seite mit rauer Oberfläche bietet den Zellen gute Voraussetzungen zum Adhärieren, wohingegen die glatte Seite dies nicht begünstigt.

Zunächst wurden die Gefäße und Kammern mit PBS-D/1 % BSA für eine Stunde vorinkubiert, um unspezifische Bindungen der Chemokine an die Plastikoberfläche zu reduzieren. Nach anschließender Trocknung wurden zur Reduktion der Verdunstung sowohl die untere Kammer als auch die verdünnten Stimuli (in Cl-Medium, siehe Anhang) auf Eis gekühlt. Nun wurde in die Kammern der unteren Komponente die jeweiligen Stimuli platziert und nachfolgend die Membran luftblasenfrei auf die untere Komponente gelegt. Nach Abdichtung erfolgte die Fixierung der beiden Komponenten. Nach einer 20 bis 30-minütigen Anwärmphase auf  $37^{\circ}$ C wurde der sich bei Erwärmung ausdehnende und in die obere Kammer übertretender Stimulus vorsichtig mit einer Pasteurpipette entfernt. Die T-Zellen wurden vor ihrer Verwendung gewaschen, auf  $2 \times 10^6$  /ml in Cl-Medium eingestellt und für 10 Minuten bei  $37^{\circ}$ C vorinkubiert. In die obere Kammer wurde luftblasenfrei  $50\mu$ l Zellsuspension gegeben und anschließend der ganze Ansatz für 150 min bei  $37^{\circ}$ C in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Zellwanderung durch Entfernung der Zellsuspension aus der oberen Kammer gestoppt und mit kaltem Cl-Medium befüllt. Nach 10

Minuten Inkubation auf Eis wurde das Medium abgesaugt, die Kammer zerlegt und die Zellsuspensionen aus den unteren Kammern (je 30µl) in eine Mikrotiterplatte überführt. Residuelle Zellen wurden in 20 µl Cl-Medium, dem 5µl einer 1 % Triton-X-100 Lösung (siehe Anhang) zugegeben wurde, lysiert und das Lysat zu der sich bereits in der Mikrotiterplatte befindenden Zellsuspension gegeben. Die Zahl, der in die untere Kammer gewanderten Zellen, wurde über deren Gehalt an endogener β-Glukuronidase bestimmt. wobei das entstehende p-Nitrophenol im alkalischen Bereich eine intensive Gelbfärbung vermittelt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde 50 µl Substratpuffer (siehe Anhang) gegeben, für 40 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Glyzin-Puffer (siehe Anhang) gestoppt. Die Menge des entstandenen p-Nitrophenol wurde im Mikrotiterplattenphotometer durch Bestimmung der Extinktion bei  $\lambda = 405$  nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte über eine Standardreihe, bei der 50  $\mu$ l einer Zellsuspension (2 x 10<sup>6</sup>/ml) über sechs Schritte seriell im Verhältnis 1:2 in Cl-Medium ausverdünnt, die Zellen nachfolgend lysiert und die Menge der enthaltenen β-Glucuronidase ebenfalls enzymatisch bestimmt wurde. Für alle Ansätze erfolgten Doppelbestimmungen.

In einigen Ansätzen wurden die Zellen bevor sie im Chemotaxis-Assay verwendet worden sind, mit verschiedenen Inhibitoren vorinkubiert. Hierzu wurden die Zellen in verschiedene Ansätze unterteilt und mit unterschiedlichen Inhibitoren versetzt. Forskolin, dbcAMP, dbcGMP, ddAdenosin und Ro-20-1724 wurden für 10 Minuten und alle verwendeten Inhibitoren der Signaltransduktion für 20 Minuten mit den Zellen bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten einerseits unbehandelte Zellen und andererseits Zellen, welchen eine entsprechende Menge an Lösungsmittel des jeweiligen Inhibitors zugefügt worden war.

#### 2.8.2 Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Die Methode des Chemotaxis-Assays für neutrophilen Granulozyten entsprach im Wesentlichen dem unter 2.8.1. beschriebenen Verfahren für T-Lymphozyten. Abweichend hierzu wurden PVP-haltige Polycarbonatmembranen (NeuroProbe) mit einer Porenweite von 3 µm verwendet. Vor ihrer Verwendung wurden diese Filter für 10 min in 96% Ethanol äquilibriert und nachfolgend für 10 min in ethanolischer 1M NaOH (siehe Anhang) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Aqua dest. und Äquilibrierung in Chemotaxis-Phosphatpuffer (siehe Anhang) wurden die Filter getrocknet und danach wie unter 2.8.1 beschrieben

verwendet. Als Versuchsmedium diente PBS-D mit Calcium, Magnesium und 0,1 % BSA (siehe Anhang). Um eine Voraktivierung der Zellen zu verhindern, wurden diese zunächst in Calcium- und magnesiumfreiem Medium vorgewärmt und erst kurz vor der Übertragung in die Kammern die entsprechende Menge an Ionen hinzugegeben. Nach 60 Minuten bei 37°C wurde die Zellwanderung durch Aspiration der Zellsuspension aus der oberen Kammer beendet. Nach Überführung und Lysieren der Zellsuspension aus den unteren Kavitäten, wurde die Zahl der gewanderten Zellen nach unter 2.8.1 beschriebenen Methode bestimmt. Aufgrund des höheren Gehaltes der neutrophilen Granulozyten an Glukuronidase wurde die Enzymreaktion jedoch bereits nach 18 Stunden beendet.

## 2.9 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen

#### 2.9.1 Markierung der Zellen

Humane MNZ, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und murine T-Zellen wurden entweder direkt nach der Isolierung oder nach der jeweiligen Kultur verwendet. Nach Zentrifugation (300 xg, 10 min, RT) wurden die Zellen einmal mit PBS-D/0,1% BSA gewaschen und Aliquots a 100  $\mu$ l Zellsuspension (2 x10<sup>6</sup>/ml) in 5 ml Polycarbonatröhrchen (BD, Heidelberg) auf Eis überführt. Für die direkte Immunfluoreszenzfärbung wurde nach erneuter Zentrifugation das Pellet in 100  $\mu$ l Lösung des fluorochromkonjugierten Primärantikörpers resuspendiert. Nach Inkubation für 60 min auf Eis wurden die Proben mit je 1,25 ml PBS-D/ 0,1% BSA versetzt, mit 300  $\mu$ l FCS unterschichtet und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C).

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellsedimente danach in je 100 µl Lösung des sekundären Dichlorotriazinylaminofluoreszin (DTAF) gekoppelten-Antikörpers (Ziege-anti-Maus, Dianova, Hamburg) aufgenommen und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Wiederholung des oben beschriebenen Waschschrittes wurden die Zellen in 150 µl PBS-D/0,1% BSA resuspendiert und mit 150 µl 3%iger Paraformaldehydlösung (siehe Anhang) fixiert. Die Proben wurden bis zur Analyse in der Durchflusszytometrie bei 4°C in Dunkelheit für maximal zwei Tage aufbewahrt.

Zum Nachweis von intrazellulären Bindungsstellen des mAK BI-1 wurden die Zellen vor der Markierung fixiert und mit Triton-X-100 permeabilisiert. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 200 µl 3 %iger Paraformaldehydlösung aufgenommen und für 20 min auf Eis fixiert. Nach Zentrifugation (300 xg 10 min, RT) erfolgte die Permeabilisierung in 200 µl 0,1 % Triton-X-

100 (siehe Anhang) für 5 min bei RT. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Markierung der Zellen nach der oben beschriebenen Vorgehensweise.

#### 2.9.2 Nachweis der PF4-Bindung auf T-Zellblasten

Zur Prüfung auf ihre Kapazität zur Bindung von PF4 wurden T-Zellen mit ansteigenden Mengen des Chemokins beladen und zellassoziertes PF4 mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Hierzu wurden 0,2 x 10<sup>6</sup> T-Zellblasten in 100 µl PBS-D/0,1% BSA für 90 min auf Eis mit PF4 in den angegeben Konzentrationen inkubiert oder verblieben ohne PF4. Zur Entfernung des nicht gebundenen PF4, wurden die Proben mit je 1,25 ml PBS-D/ 0,1% BSA versetzt, mit 300 µl FCS unterschichtet und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4°C). Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für 30 min auf Eis im Dunkeln mit dem monoklonalen Antikörper gegen PF4 (Klon PF63.1, IgG<sub>1</sub>). Nach einem erneuten Waschschritt wurden die Zellen fixiert. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die T-Zellblasten maximal zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

#### 2.9.3 Analyse im Durchflusszytometer

Im Anschluss an die Immunfluoreszenzmarkierung der Zellen wurde das Fluoreszenzsignal in einem Durchflusszytometer (FACS-Calibur, Becton-Dickinson, Basel, Schweiz) gemessen. Dabei durchlaufen die Zellen in einem feinen gleichbleibenden Pufferstrom (PBS-Azid, siehe Anhang) den Lichtstrahl eines Argonlasers (488 nm Wellenlänge). Das von den Zellen mit unveränderter Wellenlänge gestreute Licht und das in den langwelligen Bereich verschobene emittierte Fluoreszenzlicht wird durch Photodetektoren registriert. Dabei werden die Messwerte für jede einzelne, die Detektoren passierende Zelle, als ein Ereignis gespeichert. Die Streulichtsignale erlauben eine Differenzierung der Zellen nach Größe und optischer Dichte. Das Vorwärtsstreulicht wird in einem Winkel von bis zu 10° der ursprünglichen Strahlungsrichtung aufgenommen und stellt ein Maß für die Zellgröße dar. Das in einem Winkel von 90° gemessene Seitwärtsstreulicht verhält sich proportional zur optischen Dichte, welche im Wesentlichen von ihrer Granularität bestimmt wird. Zusätzlich wird im 90° Winkel auch das Fluoreszenzsignal erfasst. Auf diese Weise kann das Emissionslicht von Fluorochromen, die über Antikörper an die Zellen gebunden sind und vom Laser angeregt werden, gemessen werden. Die Messungen wurden mit einem Durchflusszytometer vorgenommen und die Daten mit dem dazugehörigen Computerprogramm (CellQuest Pro) analysiert.

Pro Messvorgang wurden 10.000 Ereignisse aufgenommen. Von diesen Ereignissen wurden die von den Zellen stammenden Signale mit charakteristischem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht durch Festlegung eines Messbereiches (Fenster) eingegrenzt und die restlichen, von Zelltrümmern hervorgerufenen Signale außerhalb des Fensters ausgeblendet. Nur lebende Zellen wurden zur Auswertung im Histogramm herangezogen. Dabei wurde die für die gesamte Zellpopulation repräsentative mediane Fluoreszenzintensität rechnerisch ermittelt.

#### 2.10 Immunzytochemische Färbung für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Der Nachweis von Ras und rezeptorgebundenem PF4 auf Objektträgerpräparaten von T-Zellblasten erfolgte mithilfe der immunzytochemischen Färbetechnik. Hierzu wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1 x10<sup>6</sup>/ml in PBS/30 % FCS aufgenommen und 100  $\mu$ l in einer Zentrifuge (Cytospin, Shandon, Dreieich) bei 800 U/min für 3 min auf Objektträger zentrifugiert. Die Objektträgerpräparate wurden getrocknet und bis zur eigentlichen immunzytochemischen Färbung bei -20°C aufbewahrt.

Für die PF4-Färbung wurden zunächst 75 µl einer 4 µM PF4-Lösung auf die Objektträger gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% BSA wurden 75 µl des direktmarkierten anti-PF4-Antikörpers-Alexa 488 (1:80) und TOTO-3 zur Kernfärbung (1:500, Invitrogen, Karlsruhe) auf die Zellen pipettiert und für 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 3% Para-Formaldehyd für 5 min fixiert. Abschließend wurde auf die fixierten Zellen 10 µl DABCO-Lösung (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, Sigma) getropft und das Präparat mit einem Deckglas bedeckt. Für den Ras-Nachweis sind die einzelnen Arbeitsschritte schematisch in Abbildung 2.10.1 gezeigt. Als Primärantikörper wurden sowohl der Maus-anti-Ras-Antikörper wie auch eine Isotypkontrolle (jeweils 5µg/ml) eingesetzt. Als Sekundärantikörper fand ein Ziege-anti-Maus-Alexa488-konjugierter-Antikörper (1:300) Verwendung.



Abbildung 2.10.1: Schematischer Ablauf der immunzytochemischen Färbung für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Für den Nachweis von CXCR3A/B und CXCR3B auf T-Zellblasten erfolgte die Markierung der Zellen wie unter 2.9.1 für die Durchflusszytometrie beschrieben, nur dass zusätzlich bei der Inkubation mit Sekundärantikörperlösung eine Kernfärbung mit TOTO-3 (1:300) durchgeführt wurde. Nach der abschließenden Fixierung der Zellen wurden mittels Zentrifugation (800 U/min, 3 min, RT) Objektträgerpräparate hergestellt, diese mit 10 µl DABCO-Lösung betropft und mit einem Deckglas bedeckt.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP (Leica, Bensheim) angefertigt und elektronisch mit Corel Photo-Paint ausgewertet und weiterbearbeitet.

#### 2.11 Bestimmung der intrazellulären Kalzium-Konzentration

Die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration in T-Zellblasten wurde nach der Methode von Grynkiewicz *et al.* (82) durchgeführt. Hierbei diente der Fluoreszenzfarbstoff 1-[2-5-Carboxyoxazol-2-yl-6-aminobenzfuran-5-oxyl]-2-amino-5'-methyloxy-ethan-

N,N,N',N'-tetraessigsäure (FURA-2) als Indikator. Durch Veresterung mit Azetoxymethanol (AM) liegt FURA-2 in einer lipophilen Verbindung vor, die von den Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert werden kann. Das hydrolysierte FURA-2 ist nicht membranpermeabel und akkumuliert in den Zellen. FURA-2 bildet Komplexe mit den intrazellulären Kalziumionen und ändert dabei die Lage seines Absorptionsmaximums (von 380 nm des freien FURA-2 zu 340 nm des FURA-2-Calciumkomplexes). Bei ständig wechselnder Anregung mit Licht der Wellenlängen von  $\lambda_{A1} = 340$  nm (F<sub>1</sub>) bzw. von

 $\lambda_{A2} = 380$  nm (F<sub>2</sub>) kann das emittierte Fluoreszenzsignal bei  $\lambda_E = 510$  nm aufgenommen werden. Aus dem Verhältnis der beiden emittierten Fluoreszenzintensitäten R = F<sub>1</sub>/F<sub>2</sub> lässt sich die Calciumkonzentration nach folgender Formel berechnen:

 $[Ca^{2+}]_i = K_D x [(R-R_{min}) / (R_{max}-R)] x [F_{2f}/F_{2b}]$ 

Dabei ist:

 $K_D$  = effektive Dissoziationskonstante des FURA-2/Ca<sup>2+</sup> Komplexes ( $K_D$  = 224 nM)

 $R_{max}$  = Verhältnis  $F_1/F_2$  bei maximaler Beladung von FURA-2 mit Kalziumionen

 $R_{min}$  = Verhältnis  $F_1/F_2$  bei unbeladenem FURA-2

 $F_{2f}$  = Fluoreszenzintensität (F<sub>2</sub>) der unbeladenen FURA-2-Probe

 $F_{2b} = F_2$  der gesättigten FURA-2-Probe

#### 2.11.1 Beladung der Zellen mit FURA-2

T-Lymphozyten (10 x10<sup>6</sup>) wurden in 1 ml PBS-D/0,01 % BSA aufgenommen und mit 2µl FURA-2-Stammlösung (2 µM Endkonzentration; Sigma) für 30 min im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. Überschüssiges FURA-2/AM wurde durch Zentrifugation (300g, 3 min, RT) entfernt, die Zellen in 1 ml PBS-D + Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>/0,01 % BSA resuspendiert und 5 Minuten bei 37°C auf dem Thermoschüttler vorinkubiert. Einige der Proben erhielten während dieser Zeit zusätzlich 4 µM PF4. Nach Ablauf der Vorinkubation wurde die Zellsuspension in die vorgewärmte Quarzküvette des Spektralfluorometers überführt.

#### 2.11.2 Analyse der Zellen im Spektralfluorometer

37°C temperierten Die mit FURA-2 beladenen Zellen wurden in einem auf Technology Spektralfluorometer (Photon International, Wedel) alternierenden Anregungswellenlängen  $\lambda_{A1} = 340$  nm und  $\lambda_{A2} = 380$  nm ausgesetzt und das emittierte Fluoreszenzlicht bei  $\lambda_E = 510$  nm aufgenommen. Nach 50 Sekunden Vorlauf erfolgte die Zugabe des Stimulus in die Meßküvette und das Fluoreszenzsignal wurde für 5 min aufgezeichnet. R<sub>max</sub> und R<sub>min</sub> wurden nach jeder Messung durch die Lyse der Zellen in 0,05 % reduziertem Triton X-100 und anschließender Zugabe des Chelatbildners Ethylenglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA, 10 mM) bestimmt.

#### 2.12 Molekularbiologische Methoden

#### 2.12.1 RNA-Isolation

Mithilfe des NucleoSpin RNA II Kits (Machery& Nagel, Düren) wurde nach Herstellerangaben aus humanen T-Zellen die Gesamt-Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, RNA) isoliert. Hierzu wurden Lymphozyten entweder direkt nach der Isolation (10  $\times 10^6$ ), nach drei oder sieben Tagen Kultur (5  $\times 10^6$ ) verwendet. Nach Zentrifugation (6 min, 600 U/min, RT) erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 350 µl des Puffers RA1 in Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma). Um unlösliches Material zu entfernen und gleichzeitig die Viskosität der Probe zu reduzieren, wurde das Zelllysat auf eine NucleoSpin®-Filtereinheit gegeben und bei 11.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Zur Herstellung von optimalen Bedingungen der RNA-Bindung wurde der Durchlauf mit 350 ul 70 % Ethanol versetzt und auf eine NucleoSpin® RNAII Säule zum Binden der RNA an die Silicamembran während 30 Sekunden Zentrifugation bei 11.000 U/min gegeben. Durch die Zugabe von 350 µl MDB (membrane desalting buffer) wurde die auf der Säule gebundene RNA gewaschen (Zentrifugation: 11.000 U/min, 1 min). Zur Beseitigung von kontaminierender DNA (desoxyribonucleic acid), wurde die gebundene RNA 15 Minuten bei RT mit DNase I behandelt. Durch die Zugabe von 200 µl RA2 wurde die DNase inhibiert. Nach erneuter Zentrifugation (11.000 U/min, 30 s) erfolgten zwei Waschschritte mit 600 µl bzw. 250 µl RA3 und Zentrifugation für 30 s oder zwei Minuten bei 11.000 U/min. Schließlich wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 11.000 U/min von der Säule eluiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA erfolgte durch Messung der Absorption bei  $\lambda$ = 260 nm (Nukleinsäuren) sowie  $\lambda$ = 280 nm (Proteine).

#### 2.12.2 Reverse Transkription und Synthese komplementärer DNA

Zur Herstellung von komplementärer DNA (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) diente das First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot). Hierzu wurden 500-800 ng der isolierten RNA in einem maximalen Volumen von 10µl mit 1µl

Oligo-(dT)<sub>18</sub>-Primer-Fertiglösung gemischt und zunächst 5 min bei 70 °C in einem MJ Mini Personl Thermal Cycler (Biorad, München) inkubiert, gefolgt von einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis. Nun erfolgte die Zugabe von 4  $\mu$ l 5x reaction buffer, 1  $\mu$ l RiboLock Ribonuclease Inhibitor und 2  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix und der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 2  $\mu$ l M-MuLV reverse Transcriptase, wurde die reverse Transkription für 60 min bei 37°C durchgeführt. Durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C wurde die Reaktion gestoppt.

#### 2.12.3 Real-Time Polymerasekettenreaktion

Diese Variante der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) bietet die Möglichkeit zur Quantifizierung einer exprimierten RNA in Relation zu einem Standard. Man unterscheidet hier zwischen quantitativer und semiquantitativer PCR. Bei der quantitativen PCR wird eine absolute Quantifizierung mithilfe eines definierten Standards bekannter Konzentration durchgeführt. Bei der semiquantitativen PCR erfolgt die Quantifizierung über einen relativen Mengenvergleich zwischen der Expression des Zielgens und eines sogenannten Haushaltsgens. Haushaltsgene werden allen Zellen einer Zellpopulation gleichermaßen exprimiert und unterliegen im Idealfall keiner Schwankung durch exogene Einflüsse.

Die Real-Time PCR basiert auf der Fluoreszenzdetektion bei der Amplifikation des Zielgens. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, zum einem der SYBR Green-Assay und zum anderen der Sonden-basierte TaqMan-Assay.

#### 2.12.3.1 LightCycler TaqMan-Assay

Bei dieser Methode werden zur Detektion sogenannte TaqMan-Sonden verwendet. Diese

Nukleotide sind zu einem Abschnitt der Zielgene komplementär und tragen am 5'-Ende ein Fluorochrom und am 3' Ende einen sogenannten Quencher. Bei intakter Sonde kommt es aufgrund der räumlichen Nähe von Fluorochrom und Quencher zur Auslöschung der Fluoreszenz. Trifft das Enzym Taq-Polymerase bei der Elongation mit seiner doppelstrangspezifischen 5'-Nukleaseaktivität auf die gebundene Sonde, wird diese abgebaut und spaltet somit Fluorochrom vom Quencher ab. Der vergrößerte räumliche Abstand der beiden ermöglicht nun die Fluoreszenz der Sonde. In Abhängigkeit zu der Menge an abgebauter Sonde erhöht sich proportional die gemessene Fluoreszenz. Das verwendete Kit stammte von der Firma Roche.

Ansatz für die TaqMan-PCR in einem Volumen von 10µl enthielt:

2 μl TaqMan Master Mix
0,2 μl 10 μM *forward primer*0,2 μl 10 μM *reverse primer*0,1 μl 100 nM Sonde
2 μl cDNA (erhalten aus reverser Transkrition)
5,5 μl H<sub>2</sub>O

Unter folgenden Bedingungen wurde die PCR in dem Lightcycler® 2.0 (Roche) durchgeführt:

- 1) 10 min 95°C sog. heißer Start
- 2) 10 s 95°C initiale Denaturierung
- 3) 30 s 60°C Anlagerung und der Primer und Amplifikation
- 4) 1 s  $72^{\circ}$ C Aufnahme
- 5) 44-malige Wiederholung der Schritte 2-4
- 6) 30 s  $40^{\circ}$ C Abkühlen

Die verwendeten Primer sind nachfolgend in Tabelle 3 dargestellt:
Primer	UPL-	Sense 5'3'	Produktlänge (bp)
	Sonde #	Antisense 5'3'	
CXCR3A	3	ACC ACA AGC ACC AAA GCA G	93
		CTT GGT GGT CAC TCA CCT CA	
CXCR3B	81	GCG GAT GGA GTT GAG GAA G	63
		GCA GCT CCT CCT ATA ACT GTC C	

Tabelle 3: Verwendete Primer mit ihren jeweiligen Sonden, Sequenzen und Fragmentgrößen

UPL = *Universial Probe Library*; bp = Basenpaare

Die verwendeten Sonden wurden von der Firma Roche erworben und die verwendeten Primer stammten von der Firma Metabion (Martinsried).

# 2.12.3.2 LightCyler SYBR Green I

Bei dieser Methode findet der Farbstoff SYBR Green I Verwendung, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Einlagerung in die DNA führt zu einer starken Zunahme der Fluoreszenz. Die Intensität des emittierten Signals ist direkt proportional zur entstandenen Menge an doppelsträngiger DNA. Das verwendete Kit wurde bei der Firma Roche erworben.

Ansatz für die SYBP Green I-PCR in einem Volumen von 10µl enthielt:

2 μl SYBR Master Mix
0,5 μl 10 μM *forward primer*0,5 μl 10 μM *reverse primer*2 μl cDNA (erhalten aus reverser Transkrition)
5 μl H<sub>2</sub>O

Unter folgenden Bedingungen wurde die PCR in einem Lightcyler® 2.0 (Roche) durchgeführt:

- 1) 10 min 95°C sog. heißer Start
- 2) 10 s 95°C initiale Denaturierung
- 3) 10 s 60-52°C (pro Zyklus 0,5° weniger) Anlagerung und der Primer und Amplifikation
- 4) 1 s  $82^{\circ}$ C Aufnahme
- 5) 44-malige Wiederholung der Schritte 2-4
- 6) 30 s  $40^{\circ}$ C Abkühlen

Zum Nachweis des Haushaltsgens  $\beta_2$ -Mikroglobulins wurde 5'-GCT GTC CTC GCG CTA CTC TC-3' als Sense-Primer, 5'-GCG GCA TCT TCA AAC CTC CAT-3' als Antisense-Primer verwendet. Beide Primer stammten von der Firma Metabion.

Zur relativen Quantifizierung des zu untersuchenden Gens wurde der Quotient aus Zielgen und Haushaltsgen ( $\beta_2$ -Mikroglobulin) gebildet. Um den Einfluss der Stimulation während der Kultur der T-Zellen zu veranschaulichen, wurden die errechneten Daten wiederum auf Tag null der Stimulation normalisiert.

# 2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach deren Größe wurde unter Verwendung einer Agarosegelmatrix (3% (w/v) Agarose (PeqLab, Erlangen) in 1x TAE (Millipore Corp., Schwalbach) in horizontalen Gelkammern (Roth, Karlsruhe) unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Zu den Proben (10 µl) wurde 2 µl 6x Gelladepuffer (Roth) gegeben. Zur Abschätzung der Größe der aufgetragenen DNA-Moleküle wurde stets ein Größenstandard (100 bp DNA-Leiter, Roth) mit aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 100 V und de Auftrennung erfolgte für 45 min. Als Nachweisreagenz wurde der flüssigen Agarose Ethidiumbromid (Roth) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt, welches mit DNA-Molekülen interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht ( $\lambda$  = 302 nm) fluoresziert ( $\lambda$  = 590 nm). Dies wurde mittels des GelDoc 2000 Systems der Firma Biorad (München) detektiert und dokumentiert.

# 2.13 Assay zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehaltes

Die Bestimmung des intrazellular gebildeten cAMP erfolgte mithilfe des cAMP-Parameter-Assay-Kits der Firma R&D Systems (Wiesbaden). Dieser Assay basiert auf einer Kompetition von in der Probe befindlichem cAMP mit einem HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelten cAMP definierter Konzentration um die Bindung an einen cAMP-spezifischen monoklonalen Antikörper.

Pro Versuchansatz wurden  $2 \times 10^7$  T-Zellblasten gewaschen und in einer Konzentration von

 $1 \text{ x}10^7$ /ml in Cl-Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen für eine Minute ,5, 10 oder 30 Minuten bei 37°C unter Agitation mit PF4 (4µM) oder Forskolin (10µM) stimuliert oder verblieben unstimuliert. Durch Zentrifugation (11800 xg, 30 sec, RT) und Resuspension des Pellets in 200 µl Cell Lysis Buffer wurde die Stimulation gestoppt.

Die weitere Analyse des cAMP-Gehaltes wurde laut Hersteller-Protokoll durchgeführt.

100 µl der Zelllysate und eines definierten cAMP-Standards wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben, welche vom Hersteller mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper beschichtet war.

Nach der Zugabe von jeweils 50 µl primärem Antikörper (Maus-anti-cAMP) und HRPkonjugiertem-cAMP zu jeder Probe, erfolgte eine Inkubation für drei Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Thermomixer (500 U/min, *Eppendorf*, Hamburg). Nach dreimaligem Waschen wurden 200 µl einer Substratlösung pro Ansatz zugegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert.

Durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung wurde die Farbreaktion beendet und anschließend in einem automatischen Mikrotiterplattenphotometer (Tecam Spectra Rainbow, *Tecam GmbH*, Crailsheim) die entstandene Gelbfärbung bei einer Wellenlänge  $\lambda = 450$  nm und einer Referenzwellenlänge von  $\lambda = 540$  nm gemessen. Für alle Ansätze wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Mithilfe des mitgelieferten definierten cAMP-Standards konnte die Konzentration an cAMP in den unterschiedlichen Ansätzen bestimmt werden.

# 2.14 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und aus den erhaltenen Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. In einigen Versuchen wurden zusätzlich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Datengruppen mithilfe des Friedman-Tests bestimmt, der keine Normalverteilung der Stichprobenwerte voraussetzt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) und der Stichprobenumfang (n) sind in den entsprechenden Abbildungen angegeben.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 **PF4** hemmt die I-Tac-induzierte Chemotaxis

Bisherige Untersuchungen zur Wirkung von PF4 auf humanen T-Zellen haben gezeigt, dass das Chemokin allein keine biologischen Funktionen auf diesen Zellen zu induzieren vermag. Vielmehr moduliert PF4 Funktionen wie Proliferation oder Zytokinfreisetzung, die durch andere Stimuli, wie zum Beispiel Antigenkontakt, induziert werden. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte bereits gezeigt werden, dass PF4 keine chemotaktische Wirkung auf T-Zellen hat (61). Es stellte sich jedoch die Frage, ob PF4, vergleichbar seiner Rolle bei der Regulation langfristiger Immunfunktionen, auch modulierend auf eine durch geeignete Chemotaxine induzierte gerichtete Wanderung besitzen könnte. Als chemotaktischer Stimulus wurde in einem ersten Ansatz das CXC-Chemokin I-Tac gewählt, dessen Rezeptor CXCR3 auf allen aktivierten T-Zellen exprimiert ist und damit potentiell alle eingesetzten Zellen aktivieren kann (22).

Um einen möglichen Effekt von PF4 zu untersuchen, wurden zunächst zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen wurde PF4 zusammen mit I-Tac im unteren Teil der Chemotaxiskammer platziert und zum anderen erfolgte eine Zugabe des PF4 zu den Zellen, kurz bevor diese in die obere Kammer gegeben wurden. Als initiale Konzentration wurde 4 µM PF4 gewählt, da diese sich als optimal in der Induktion von verschiedenen Funktionen in Monozyten, neutrophilen Granulozyten und auch T-Zellen erwiesen hat (60,61,66,68). Als Kontrolle wurden jeweils Ansätze mit der entsprechenden Menge an Puffer durchgeführt. T-Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) wurden in An- und Abwesenheit von PF4 mit ansteigenden Konzentrationen an I-Tac stimuliert und nach 150 min wurde die Anzahl der sich in der unteren Kammer befindenden Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 1 dargestellt, induzierte I-Tac konzentrationsabhängig eine Chemotaxis in T-Zellen, welche bei 3 nM I-Tac maximal war. Eine weitere Erhöhung der Chemokinkonzetration führte zu einer schrittweisen Reduktion der Anzahl an wandernden Zellen. Dieses entspricht einer typischen Optimumskurve einer Chemokin-induzierten chemotaktischen Antwort. Wurde nun neben I-Tac zusätzlich PF4 in die untere Kammer gegeben (Abb.1A), fand eine Reduktion der Anzahl der gewanderten Zellen statt. Dieser Effekt wurde ab einer Konzentration von 3 nM I-Tac (15 % Inhibition gegenüber der Kontrolle) sichtbar und war bis 300 nM I-Tac (20 % Inhibition) nachweisbar. Sehr viel dramatischer fiel dieser Effekt allerdings bei den Ansätzen

aus, in denen PF4 in der oberen Kammer den Zellen hinzugefügt wurde (Abb.1B). PF4 vermittelte eine Hemmung der Chemotaxis über den gesamten Konzentrationsbereich des I-Tac.

Darüber hinaus wurde bei jeder individuellen I-Tac-Konzentration eine gegenüber dem in Abb.1A dargestellten Ansatz deutlich stärkere inhibitorische Wirkung des PF4 beobachtet. Während in Anwesenheit von PF4 bei 0,3 nM I-Tac rund 30 % und bei 3 und 300 nM I-Tac 40 % weniger Zellen migrierten als bei der entsprechenden Kontrolle, waren es bei 30 nM sogar 50 % weniger Zellen. Dieser Effekt wird noch deutlicher, wenn von der Gesamtzahl der gewanderten Zellen noch diejenige abgezogen werden, die durch ungerichtete Migration, also in Abwesenheit eines Stimulus, in die untere Kammer gewandert sind (gestrichelte Linie).



Abbildung 1: Effekt von PF4 auf die I-Tac induzierte Chemotaxis. Aufsteigende Konzentrationen von I-Tac bzw. Medium allein (gestrichelte Linie) wurden in die unteren Kompartimente einer 48-Well Chemotaxiskammer nach Boyden gegeben und die Migration von T-Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) aus dem oberen in das untere Kompartiment bestimmt (•). In Parallelansätzen wurde zusätzlich 4  $\mu$ M PF4 entweder in die unteren Kompartimente zum Stimulus (A) oder in die oberen Kompartimente zu den Zellen (B) gegeben ( $\circ$ ). Nach 150 min wurde die Anzahl der durch die Poren der Membran gewanderten Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der Daten dreier unabhängiger Experimente.

# 3.2 Charakteristika der PF4-vermittelten Inhibition der T-Zellchemotaxis

Nachdem im ersten Versuchsansatz eine inhibitorische Wirkung von 4  $\mu$ M PF4 auf die I-Tacinduzierte Chemotaxis zu beobachten war, sollte zunächst im Weiteren dieser Effekt in Bezug auf seine Konzentrationsabhängigkeit und Selektivität näher beleuchtet werden.

# 3.2.1 Einfluss der PF4-Konzentration auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis

Im folgenden Ansatz wurde geprüft, über welchen Konzentrationsbereich PF4 die I-Tac induzierte Chemotaxis von T-Zellen inhibieren kann. Dazu wurden T-Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) mit 1 nM oder 10 nM I-Tac stimuliert, bzw. blieben unstimuliert und wurden dabei ansteigenden Konzentrationen an PF4 ausgesetzt. Analog der unter 3.1 beschriebenen Vorgehensweise wurde das PF4 in einem Ansatz in die unteren Kammern zum Stimulus gegeben, während in einem zweiten Ansatz PF4 in die oberen Kammern platziert wurde. Die in Abbildung 2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass PF4 dosisabhängig eine Hemmung der I-Tac-induzierten Chemotaxis in T-Zellen vermittelte. Dies gilt sowohl für den Ansatz der Koinkubation der beiden Chemokine in der unteren Chemotaxiskammer (Abb.2A und C), als auch für die Inkubation der Zellen mit PF4 in der oberen Kammer (Abb.2B und D). Der inhibitorische Effekt wurde bereits bei einer Konzentration von 0,5 µM PF4 sichtbar (15 % Inhibition gegenüber der unbehandelten Kontrolle) und steigerte sich auf 50 % Inhibition bei einer PF4-Konzentration von 8 µM. Wie sich bereits in dem vorangegangenen Experiment gezeigt hatte, trat der inhibitorische Effekt insgesamt deutlicher hervor, wenn die Zellen in der oberen mit dem PF4 inkubiert worden waren, als in dem Ansatz, bei dem sich das PF4 in der unteren Kammer beim Stimulus befand. Obwohl bei 8 µM noch eine Steigerung des inhibitorischen PF4-Effektes zu beobachten war und somit noch kein Maximum erreicht wurde, verzichtete ich auf Grund der fehlenden physiologischen Relevanz darauf, höhere PF4-Konzentrationen zu verwenden. In den weiteren Versuchen wurde eine Konzentration von 4 µM PF4 verwendet, da hier bereits ein deutlicher inhibitorischer Effekt sichtbar war.



Abbildung.2: Effekt steigender PF4-Konzentrationen auf die I-Tac induzierte Chemotaxis. 1 nM und 10 nM I-Tac bzw. Medium allein (gestrichelte Linie) wurden in die unteren Kompartimente einer 48-Well Chemotaxiskammer nach Boyden gegeben und die Migration von T-Zellen  $(0,1 \times 10^6/\text{Ansatz})$  aus dem oberen in das untere Kompartiment bestimmt (•). In Parallelansätzen wurde zusätzlich ansteigende Konzentrationen von PF4 entweder in die unteren Kompartimente zum Stimulus (A und C) oder in die oberen Kompartimente zu den Zellen (B und D) gegeben. Nach 150 min wurde die Anzahl der migrierten Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Anzahl an gewanderten Zellen/Ansatz und auch der errechneten prozentualen Inhibition der entsprechenden Kontrolle ohne PF4 aus vier (A und C) bzw. fünf (B und D) unabhängigen Experimenten.

# 3.2.2 Die Vorinkubation der T-Zellen mit PF4 hat keinen Einfluss auf die I-Tac vermittelte Chemotaxis

Bei einer Reihe von durch PF4-vermittelten Effekten auf Monozyten, wie zum Beispiel der Freisetzung von TNF, konnte gezeigt werden, dass ein kurzer, transienter Kontakt der Zellen mit PF4 zur Induktion der vollständigen biologischen Antwort ausreichend war (68). Um zu prüfen, ob dies auch für den inhibitorischen Effekt auf die I-Tac-vermittelte Chemotaxis gültig ist, wurden T-Zellen (2x10<sup>6</sup>/ml) für 10 Minuten mit PF4 (4µM) bei 37°C inkubiert und nachfolgend das freie Chemokin durch Ersetzen des Mediums entfernt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen verwendet und Ansätze, bei denen PF4 während der gesamten Dauer des Assays in der oberen Kammer bei den Zellen anwesend war. Die unterschiedlich vorbehandelten Zellen wurden anschließend auf ihre Kapazität zur Wanderung gegenüber steigenden Konzentrationen von I-Tac geprüft.

Überraschenderweise zeigte sich, dass eine reine Vorinkubation der T-Zellen mit PF4 keinen Einfluss auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis hatte, wohingegen die dauerhafte Anwesenheit von PF4 während der Zellwanderung eine drastische Inhibition der Chemotaxis hervorrief (Abb.3). Eine Verlängerung der Vorinkubationszeit mit PF4 auf 30 Minuten veränderte dies Ergebnis nicht, während eine Extension über 30 min hinaus zu einer drastischen Verringerung der chemotaktischen Antwort in allen Ansätzen bewirkte (Daten nicht gezeigt). Insgesamt ist hieraus zu schließen, dass PF4 permanent auf die Zellen einwirken muss, um seine inhibitorische Wirkung zu entfalten.

# 3.2.3 Effekt von PF4 auf die MIG und IP-10 induzierte Chemotaxis in T-Zellen

Wie oben gezeigt, hemmt PF4 in Abhängigkeit von seiner Konzentration die I-Tac-induzierte Chemotaxis. Da der CXCR3 neben I-Tac auch die Chemokine MIG und IP-10 bindet, stellte sich die Frage, ob PF4 generell eine über CXCR3 vermittelte Chemotaxis beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von PF4 sowohl in Anwesenheit von PF4 in der unteren Kammer beim Stimulus als auch bei der Inkubation der T-Zellen mit PF4 in der oberen Kammer untersucht.



Abbildung 3: Die Vorinkubation von T-Zellen mit PF4 vermittelt keine Hemmung der Chemotaxis. T-Zellen  $(2 \times 10^6/\text{ml})$  wurden für 10 min mit PF4 (4µM) vorinkubiert (□) oder verblieben ohne PF4 (•). Nach Entfernung des freien PF4 wurde die Migration der Zellen  $(0,1 \times 10^6)$  gegenüber steigenden Konzentrationen von I-Tac oder Medium allein (gestrichelte Linie) bestimmt. In Kontrollansätzen wurde das PF4 in die obere Kammer zu den Zellen gegeben und verblieb dort während des gesamten Experiments (○). Nach 150 min wurde die Anzahl der gewanderten Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Daten dreier unabhängiger Experimente.

Dazu wurden T-Zellen  $(0,1 \times 10^6/\text{Ansatz})$  mit ansteigenden Konzentrationen von MIG oder IP-10 stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die Versuche wurden wie unter 3.1 beschrieben durchgeführt.

Verglichen mit den Ergebnissen der I-Tac-induzierten Chemotaxis verliefen die durch MIG und IP-10 erhaltenen Dosis-Antwort Kinetiken etwas anders. Während die I-Tac-vermittelte Antwort bereits bei 3 nM des Chemokins maximal war (Abb.1), induzierte MIG ein breites Maximum zwischen 30 nM und 100 nM (Abb.4A und B). IP-10 erwies sich dabei als deutlich schwächerer Stimulus mit einem ungewöhnlich breiten Plateau, welches sich von 1 nM bis 30 nM erstreckte (Abb.4C und D). Wurde neben MIG auch PF4 in die untere Kammer platziert (Abb.4A), so zeigte sich in den Konzentrationen bis 10 nM MIG die Migration der Zellen unverändert. Ab 30 nM MIG hemmte PF4 allerdings deutlich (bis zu 45 % Inhibition gegenüber der Kontrolle) die MIG-induzierte Chemotaxis. In den Ansätzen bei denen die T-Zellen mit PF4 inkubiert wurden (Abb. 4B), zeigte sich schon ab einer Konzentration von 3 nM MIG ein inhibitorischer Effekt des PF4 von circa 15 % Inhibition, welcher sich auf worden waren (Abb. 4D).

50 % Inhibition bei einer MIG-Konzentration von 100 nM steigern ließ. Wurde PF4 gemeinsam mit IP-10 in die untere Kammer gegeben, so zeigte sich bei allen IP-10-Konzentrationen eine verminderte Wanderung (Abb.4C). Interessanterweise hatte PF4 keinen Effekt auf die IP-10-induzierte Chemotaxis, wenn die T-Zellen mit PF4 inkubiert



Abbildung 4: Effekt von PF4 auf die MIG- und IP-10-induzierte Chemotaxis. Aufsteigende Konzentrationen von MIG (A und B) oder IP-10 (C und D) bzw. Medium allein (gestrichelte Linie) wurden in die unteren Kompartimente einer 48-Well Chemotaxiskammer nach Boyden gegeben und die Migration von T-Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) aus dem oberen in das untere Kompartiment bestimmt (•) In Parallelansätzen wurde zusätzlich 4  $\mu$ M PF4 entweder in die unteren Kompartimente zum Stimulus (A und C) oder in die oberen Kompartimente zu den Zellen (B und D) gegeben ( $\odot$ ). Nach 150 min wurde die Anzahl der durch die Poren der Membran gewanderten Zellen bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von fünf bzw. von vier (B) unabhängiger Experimenten. \* zeigt statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen Ansätzen mit und ohne PF4.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass PF4 prinzipiell in der Lage ist, auch die durch die anderen beiden Liganden des CXCR3 induzierte Chemotaxis zu hemmen. Während der Effekt von PF4 auf die MIG-vermittelte Chemotaxis dem auf die I-Tac-vermittelte Chemotaxis vergleichbar ist, scheint dessen Wirkung bei der IP-10-Chemotaxis jedoch anders zu sein. Die Beobachtung, dass nur ein Effekt in den Ansätzen der Koinkubation der beiden Chemokine nachweisbar war, deutet auf einen anderen Mechanismus der Inhibition hin.

In den ersten Ergebnissen hatte sich herausgestellt, dass PF4 in der Lage ist, auch kurzfristige Funktionen von T-Zellen zu modulieren. Wie hier gezeigt unterlag auch die Chemotaxis einer negativen Regulation, wie sie schon zuvor für die Proliferation und die Zytokinausschüttung von antigenstimulierten T-Zellen bestimmt wurde. Die Hemmung der Chemotaxis trat bei allen CXCR3-Liganden I-Tac, MIG und IP-10 auf.

# 3.3 Untersuchungen zum PF4-Rezeptor

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten eine deutliche Reduzierung der chemotaktischen Antwort von T-Zellen auf I-Tac und MIG durch PF4 gezeigt werden konnte, sollten im zweiten Teil der Arbeit die dieser Inhibition zugrunde liegenden Mechanismen näher untersucht werden. Dabei sollte zunächst geklärt werden, welche PF4-Rezeptoren an der Regulation der T-Zellaktivität beteiligt sind. Konsequenterweise wurde zunächst die Kapazität von T-Zellen zur Bindung von PF4 geprüft und nachfolgend die Beteiligung dieser Rezeptoren an der biologischen Antwort untersucht.

## 3.3.1 PF4 bindet an T-Zellblasten

Die Kapazität zur Bindung von PF4 an T-Zellblasten wurde mithilfe eines Bindungsassays geprüft. Dazu wurden die Zellen mit PF4 inkubiert und anschließend das gebundene PF4 über den fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörper mAK PF63.1 nachgewiesen. Die Färbungen wurden sowohl auf Einzelzellebene mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes als auch in der Durchflusszytometrie ausgewertet. Wie in Abb.5B und C dargestellt, wiesen die T-Zellblasten nach Inkubation mit PF4 eine deutliche Bindung des Chemokins auf (grüne Färbung), welche ohne Vorbehandlung mit PF4 nicht nachweisbar war (Abb.5A). Als Gegenfärbung diente der Zellkernfarbstoff TOTO-3 (rot). Zum Nachweis einer

Rezeptorsättigung und zur Bestimmung der Rezeptoraffinität wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an PF4 inkubiert und die sich anschließende Färbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen PF4 in der Durchflusszytometrie nachgewiesen. In Abbildung 5D sind die Daten von stimulierten Ansätzen im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle dargestellt. Ab einer Konzentration von 0,25  $\mu$ M PF4 fand eine Bindung statt, welche sich dosisabhängig bis zu einem Maximum bei 2  $\mu$ M steigerte und dann in der Sättigung verblieb. In einer ersten Abschätzung ergibt sich daraus eine halbmaximale Sättigung der Bindung bei ungefähr 0,8  $\mu$ M PF4. Diese Werte stimmen in etwa mit denen überein, die für frische T-Zellen beschrieben sind (61) und korrelieren mit denen unter 3.2.1 bestimmten effektiven PF4-Konzentrationen in der Hemmung der Chemotaxis.

# 3.3.2 Partielle Reduktion der PF4-Bindung durch freies CSA und nach Verdau mit Chondroitinase ABC

Bei dem von Petersen *et al.* beschriebenen Rezeptor für PF4 auf neutrophilen Granulozyten handelt es sich um einen Proteoglykanrezeptor der Chondroitinsulfat-Klasse (60). Um zu untersuchen, ob dieser Typ von Proteoglykanen auch bei der Bindung von PF4 an

T-Zellblasten beteiligt ist, wurden zunächst die Zellen (2 x10<sup>6</sup>/ml) mit dem Enzym Chondroitinase ABC (1 U/ml) für 30 min verdaut und damit die Chondroitinsulfate auf der Zelloberfläche abgebaut. Nachfolgend wurden die Zellen für 90 min mit PF4 (4  $\mu$ M) inkubiert und zellgebundenes PF4 in der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Wie in Abbildung 6A führte der Verdau der Zellen zu einer deutlichen Reduktion der PF4-Bindung um etwa 75 % . In einem zweiten Ansatz wurde dem PF4 ein Überschuss an freiem CSA beigefügt, welches mit den membranständigen Glykosaminoglykanen (GAG) um die Bindung an das PF4 konkurriert. Hierzu wurde 4  $\mu$ M PF4 für 30 min mit 20  $\mu$ g/ml CSA ersetzt, für 90 min mit den T-Zellen (2 x10<sup>6</sup>/ml) inkubiert und nachfolgend die PF4-Bindung bestimmt. Die Anwesenheit von CSA (Abb.6A) reduzierte die Menge an gebundenem PF4, verglichen mit der Kontrolle, um etwa 98 %. In einem letzten Ansatz wurde geprüft, ob eine Kombination der beiden vorangegangenen Verfahren zu einer weiteren Abnahme der Bindungskapazität führt. Es zeigte sich jedoch, dass ein zusätzlicher Enzymverdau zu keiner weiteren durch Kompetition mit freien CSA allein erreichbaren Reduktion der Bindung von PF4 führte (Abb.8B und C).



Abbildung 5: Bindung von PF4 an T-Zellen. Aktivierte T-Zellen  $(0,1 \times 10^6/\text{Ansatz})$  wurden auf Objektträger aufgetragen, mit 4 µM PF4 für 30 min inkubiert (B und C) oder verblieben ohne PF4 (A). Nach Entfernung des freien Chemokins wurde zellassoziiertes PF4 durch Bindung von Alexa488-konjugiertem mAK PF63.1 in der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie nachgewiesen. Die spezifische Färbung für PF4 (Alexa488) ist in grün und die Kernfärbung (TOTO-3) in rot dargestellt. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Alternativ wurden T-Zellen (0,2  $\times 10^6$ ) mit ansteigenden Konzentrationen von PF4 für 90 min inkubiert. Nach Entfernung des freien PF4 wurde wie oben beschrieben zellassoziiertes PF4 nachgewiesen und mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert (D). Die relative Fluoreszenzintensität errechnete sich aus dem Quotienten der medianen Fluoreszenzintensität der PF4-haltigen Proben und der PF4-freien Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte <u>+</u> Standarbabweichungen der Daten von drei unabhängigen Experimenten.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass etwa 98 % der PF4-Bindung an aktivierte T-Zellen über GAGs verläuft, bei denen es sich zumindest in 75 % um Proteoglykane handelt, die mit Chondroitinsulfatseitenketten assoziiert sind.



Abbildung 6: Reduktion der PF4-Bindung an T-Zellen nach Verdau mit Chondroitinase ABC oder in Anwesenheit von freiem Chondroitinsulfat A. T-Zellen  $(2 \times 10^6/\text{ml})$  wurden für 30 min mit Chondroitinase ABC (Chon'ase; 1 U/ml) bei 37°C verdaut oder blieben unverdaut und die Kapazität zur Bindung von PF4 (4 µM) wurde bestimmt (A). Alternativ wurden die T-Zellen (0,2  $\times 10^6/\text{Ansatz}$ ) für 90 min mit PF4 (4 µM) in An- und Abwesenheit von 20 µg/ml Chondroitinsulfat A (CSA) inkubiert (B). In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen mit Chondroitinase ABC verdaut und die PF4-Bindung in Anwesenheit von freiem CSA bestimmt, während die entsprechenden Kontrollen weder enzymatisch behandelt wurden noch freies CSA erhielten (C). In allen Ansätzen dienten Zellen ohne Inkubation mit PF4 als Negativkontrolle (rotes Histogramm). Weder der Verdau mit Chondroitinase noch die Anwesenheit von CSA hatten einen Einfluss auf die Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt). Membranassoziiertes PF4 wurde wie in der Legende zu Abb.5D beschrieben bestimmt. Die Abbildung gibt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs von insgesamt drei Experimenten wieder.

# 3.3.3 Der inhibitorische Effekt von PF4 auf die T-Zellchemotaxis wird nicht über die Bindung an GAG-Ketten von Proteoglykanen vermittelt

Um zu untersuchen, ob die an der PF4-Bindung beteiligten Proteoglykane auch funktionell an den PF4-vermittelten Effekten beteiligt sind, wurden die Chondroitinsulfate zunächst enzymatisch von der Zelloberfläche entfernt und diese Zellen auf ihre Kapazität zur Chemotaxis in Gegenwart von PF4 geprüft. Hierzu wurden T-Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) mit dem Enzym Chondroitinase ABC (1 U/ml) für 30 min bei 37°C verdaut, während entsprechende Kontrollen unter gleichen Bedingungen unverdaut blieben. Nachfolgend wurde die Wanderung der beiden Zellpopulationen in An- oder Abwesenheit von PF4 ( $4 \mu$ M) gegenüber 1 nM und 10 nM I-Tac bestimmt.

PF4-behandelte Zellen zeigten gegenüber den unbehandelten Kontrollen sowohl bei 1 nM als auch bei 10 nM I-Tac eine reduzierte Migration (Abb.7). Die Vorbehandlung der Zellen mit Chondroitinase ABC hatte weder Einfluss auf die durch I-Tac induzierte Chemotaxis noch auf die durch PF4-vermittelte Hemmung dieser Antwort.



Abbildung 7: Der Verdau von T-Zellen mit Chondroitinase ABC hat keinen Einfluss auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis. T-Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden für 30 min mit Chondroitinase ABC (Chon'ase; 1 U/ml) bei 37°C verdaut oder blieben unbehandelt und wurden anschließend in An- und Abwesenheit von PF4 (4 µM) in die obere Kammer einer 48-Well-Chemotaxiskammer gegeben. Deren Migration gegenüber 1 nM oder 10 nM I-Tac bzw. Medium allein wurde bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der Daten nach Abzug der ungerichteten (spontanen) Wanderung (5167 Zellen <u>+</u> 768) aus vier unabhängigen Experimenten.

Konsequenterweise wurde im nächsten Ansatz untersucht, ob die Neutralisierung von PF4 durch freies CSA den inhibitorischen Effekt von PF4 auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis aufzuheben vermag. Dazu wurde 4  $\mu$ M PF4 für 30 min mit 20  $\mu$ g/ml CSA versetzt und im Chemotaxis-Assay verwendet. Als Kontrolle dienten Ansätze, die entweder PF4 oder CSA allein erhielten.

Die Zugabe von PF4 zu den Zellen reduzierte deutlich die Anzahl an wandernden Zellen sowohl gegenüber 1 nM als auch 10 nM I-Tac, während CSA alleine nur einen sehr geringen Effekt auf die T-Zellchemotaxis hatte (Abb. 8). Die Anwesenheit von CSA hatte bei 1 nM I-Tac keinen und bei 10 nM I-Tac einen geringen Einfluss auf die PF4-vermittelte Inhibition.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Proteoglykane für den überwiegenden Anteil der PF4-Bindung an T-Zellen verantwortlich sind, der inhibitorische PF4-Effekt aber nicht über eine Interaktion mit diesen Molekülen vermittelt wird.



Abbildung 8: Freies Chondroitinsulfat A (CSA) hebt die Inhibition der I-Tacinduzierten Chemotaxis durch PF4 nicht auf. 1 nM und 10 nM I-Tac bzw. Medium allein wurden in die unteren Kompartimente einer 48-Well Chemotaxiskammer nach Boyden gegeben und die Migration von T-Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) aus dem oberen in das untere Kompartiment bestimmt. In Parallelansätzen wurde zusätzlich 4  $\mu$ M PF4 in An- und Abwesenheit von CSA (20  $\mu$ g/ml) in die oberen Kompartimente zu den Zellen gegeben. Nach 150 min wurde die Wanderung gestoppt und die Anzahl der Zellen in der unteren Kammer bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, denen CSA alleine zugefügt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der Daten nach Abzug der ungerichteten (spontanen) Wanderung (6230 Zellen <u>+</u> 1474) aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 3.3.4 Expression von CXCR3A- und B-mRNA in aktivierten T-Zellen

Neben der Bindung an Proteoglykanen wurde als weiterer Rezeptor für PF4 von Lasagni *et al.* die Splicevariante CXCR3B identifiziert (54), welcher auch in aktivierten T-Zellen exprimiert sein soll und für einige inhibitorische Funktionen auf Endothelzellen verantwortlich gemacht wird.

In einem ersten Ansatz wurde die mRNA-Expression der beiden Spleissvarianten während der Aktivierung der T-Zellen untersucht. Hierzu wurden T-Zellen entweder in Kultur genommen oder direkt für die mRNA-Isolation verwendet. Nach drei Tagen Aktivierung mit PHA und nach sieben Tagen mit PHA/IL-2 wurde jeweils eine Probe für die mRNA-Isolation entnommen. Nach Bestimmung des RNA-Gehaltes wurden gleiche Mengen für die RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) eingesetzt, welche wiederum in cDNA umgeschrieben wurden (siehe 2.12). Mit der gewonnenen cDNA wurde eine quantitative PCR durchgeführt, wobei CXCR3A und B und das Haushaltsgen  $\beta_2$ -Makroglobulin nachgewiesen wurden. Anschließend erfolgte zur Kontrolle die Auftrennung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese. Zur Auswertung der aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten wurde der Quotient des spezifischen Gens und des Haushaltsgens gebildet.

Wie in Abbildung 9A und B dargestellt, war sowohl CXCR3A-mRNA als auch CXCR3BmRNA in allen untersuchten T-Zellstimulationen exprimiert. Die Expression von

CXCR3A-mRNA war in unstimulierten T-Zellen ungefähr doppelt so hoch wie die von CXCR3B-mRNA (Abb.9B). In Abbildung 9C ist die relative Expression von CXCR3A und B in drei bzw. sieben Tage stimulierten T-Zellen im Vergleich zu frisch isolierten Zellen dargestellt. Nach drei Tagen Aktivierung mit PHA stieg die Expression sowohl von CXCR3A-mRNA als auch von CXCR3B-mRNA etwa um das Dreifache an. Die weitere Kultur für vier Tage in Gegenwart von IL-2 steigerte die Expression beider Rezeptorvarianten nur unwesentlich. Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden Spleissvarianten gemeinsam und gleichsinnig reguliert wurden.

Die Expression von CXCR3B-mRNA legt nahe, dass CXCR3B auch auf Proteinebene exprimiert ist und damit für die Vermittlung des PF4-Effektes in Frage käme.

# 3.3.5 CXCR3B ist in T-Zellen intrazellulär exprimiert

Nach dem Nachweis von CXCR3B-mRNA in aktivierten T-Zellen wurde nun geprüft, ob auch das Rezeptorprotein detektiert werden kann. Hierzu wurde ein neuer, in meiner Arbeitsgruppe generierter monoklonaler Antikörper (CXCR3B, Klone BI-1) verwendet. Mithilfe dieses und eines gegen beide Varianten gerichteten Antikörpers (CXCR3A/B, Klon 49801) wurden immunzytochemische Färbungen sowohl für die Konfokalmikroskopie als auch für die Analyse im Durchflusszytometer durchgeführt.

Um neben der Oberflächenexpression des Rezeptors auch intrazellulär lokalisiertes Protein nachweisen zu können, wurden die Zellen in einem zusätzlichen Ansatz vor der Färbung mittels Detergenzbehandlung permeabilisiert.



Abbildung 9: Expression von CXCR3A- und B-mRNA in aktivierten T-Zellen. T-Zellen  $(2x \ 10^6/\text{ml})$  wurden für drei Tage mit PHA (5 µg/ml) oder für sieben Tage mit PHA und IL-2 (100 U/ml) stimuliert bzw. direkt nach der Isolation verwendet. Die extrahierte mRNA wurde mittels RT-PCR in cDNA überschrieben und Fragmente der respektiven Rezeptoren mittels spezifischen Primern durch Real-time-PCR im LightCycler amplifiziert. A: Qualitative Analyse der Amplifikate nach Auftrennung in der Elektrophorese im Agarosegel (3%ig). B und C: Quantitative Analyse der PCR-Produkte. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression des spezifischen Gens (CXCR3A:  $\Box$ ; CXCR3B: **•**) zu  $\beta_2$ -Makroglobulin ( $\beta_2$ -M) (B) und die relative Expression der einzelnen Gene im Verhältnis zu ihrer am Tag null bestimmten Expression (C). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier (A) mit prinzipiell gleichem Ergebnis und die Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten (B und C). \* zeigt statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen Tag drei bzw. sieben und Tag null.

In Abbildung 10A-F ist die Oberflächenexpression von CXCR3A/B, CXCR3B und einer entsprechenden Isotypkontrolle in konfokalmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Zur Kernfärbung wurde der Farbstoff TOTO-3 verwendet (rot). Während die Färbung von CXCR3A/B (Abb.10E) ein deutliches Signal an der Zellmembran zeigte, war keine den Isotyp an Intensität übersteigende Färbung des CXCR3B erkennbar (Abb.10F). Dies Ergebnis bestätigte sich auch in der Durchflusszytometrie (Abb.10M). Erfolgte allerdings vor der Färbung eine Permeabilisierung der Zellen, so ließ sich eine Expression des CXCR3B sowohl im Mikroskop (Abb.10L) als auch durchflusszytometrisch (Abb.10N) nachweisen. Die Intensität lag dabei erwartungsgemäß unterhalb derjenigen der CXCR3A/B. Damit konnte klar gezeigt werden, dass die Spleissvariante CXCR3B von T-Zellblasten exprimiert und auch translatiert wird. Da dieser Rezeptor jedoch ausschließlich innerhalb der Zelle vorliegt, ist seine funktionelle Bedeutung zunächst unklar.

#### 3.3.6 PF4 hemmt die Chemotaxis muriner T-Zellen

In vorhergehenden Experimenten konnte ich zeigen, dass der CXCR3B intrazellulär, nicht jedoch auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, exprimiert ist. Da die Bedeutung von intrazellulären Rezeptoren nur unzureichend bekannt ist, sollte mithilfe von murinen T-Zellen die potenzielle Beteiligung des CXCR3B an der PF4-vermittelten Inhibition untersucht werden. Mäuse exprimieren zwar den CXCR3A, es findet sich im Genom jedoch keine Sequenz für die alternative Spleissvariante und somit sind sie defizient für den CXCR3B (mittels Blastsuche Ausschluß einer murinen homologen Sequenz, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, (83)).

Murine T-Zellen wurden aus C57/BL6 Wildtypmäusen isoliert, für sieben Tage mit ConA und IL-2 stimuliert und anschließend im Chemotaxis-Assay eingesetzt. Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von humanen PF4 (4  $\mu$ M) in die obere Kammer gegeben, die untere Kammer wurde entweder mit murinem oder mit humanem I-Tac befüllt und die Anzahl an gewanderten Zellen bestimmt.



**Abb. 10 CXCR3B-Expression auf T-Zellen.** Auf permeabilisierten (G-L und N) und nichtpermeabilisierten (A-F und M) T-Zellen wurden immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gerichtet gegen CXCR3A/B oder CXCR3B sowie der entsprechenden Isotypkontrolle durchgeführt. Diese wurden sowohl mittels konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (A-L) als auch Durchflusszytometrie (M und N) nachgewiesen. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei durchgeführten Experimenten.

Wie in Abbildung 11A gezeigt, induzierte murines I-Tac eine typische Optimumskurve für Chemokine mit einem Maximum an gewanderten Zellen bei Konzentrationen zwischen 3 und 10 nM I-Tac. Die Anwesenheit von PF4 führte zu einer deutlichen Hemmung der Chemotaxis zwischen 30 % und 50 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Humanes I-Tac induzierte ebenfalls eine gerichtete Wanderung der murinen T-Zellen (Abb.11B), allerdings induzierte bereits die niedrigste eingesetzte Konzentration von 0,3 nM die maximale Anzahl an wandernden Zellen. Bis zu einer Konzentration von 3 nM I-Tac blieb die induzierte Anzahl an Zellen konstant hoch und fiel dann schnell wieder ab. Die Kurve der PF4-behandelten Zellen folgte dem Verlauf der Kurve von unbehandelten Zellen, jedoch wanderten auch hier anteilig weniger Zellen (Inhibition zwischen 20 % bis 50 % gegenüber der Kontrolle).

Da PF4 auch in murinen T-Blasten in der Lage ist, die I-Tac-induzierte Chemotaxis zu hemmen, muss eine Beteiligung des CXCR3B bei der Weiterleitung des PF4-Signales ausgeschlossen werden.



Abbildung 11: Effekt von PF4 auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis muriner T-Zellen. Aufsteigende Konzentrationen von murinem I-Tac (m-I-Tac; A) oder humanem I-Tac (hu-I-Tac; B) bzw. Medium allein (gestrichelte Linie) wurden in die unteren Kompartimente einer 48-Well Chemotaxiskammer nach Boyden gegeben und die Migration von murinen T-Zellen  $(0,1 \times 10^6/\text{Ansatz})$  aus dem oberen in das untere Kompartiment bestimmt (•). In Parallelansätzen wurde zusätzlich 4 µM PF4 in die oberen Kompartimente zu den Zellen gegeben ( $\circ$ ). Nach 150 min wurde die Anzahl der durch die Poren der Membran gewanderten Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von drei (hu-I-Tac) bzw. fünf (m-I-Tac) unabhängig durchgeführten Experimenten. \* zeigt statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen PF4-stimulierten und unstimulierten Ansätzen.

Fasst man die bisher erhaltenen Ergebnisse zusammen, ist sowohl die Beteiligung des CXCR3B als auch eine Interaktion mit Chondroitinsulfat-Proteoglykanen als Vermittler der PF4-vermittelten Inhibition der T-Zell-Chemotaxis auszuschließen. Daraus muss gefolgert werden, dass PF4 diese Funktion über einen weiteren, bisher unbekannten Rezeptor vermittelt oder dass der PF4-Effekt unabhängig von der Beteiligung eines eigenen Rezeptors ausgelöst wird.

## 3.4 Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des PF4-Effekts

# 3.4.1 PF4 verändert weder die Expression von CXCR3 noch moduliert es die Interaktion von I-Tac mit seinem Rezeptor

Der PF4-vermittelte Inhibition der T-Zellchemotaxis können verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen. In einem ersten Ansatz wurde zunächst überprüft, ob PF4 die Bindung von I-Tac an den CXCR3 beeinflussen kann. Dazu wurden zunächst T-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an I-Tac oder PF4 für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Immunfluoreszenzfärbung die CXCR3-Expression auf der Oberfläche bestimmt. Um die Ergebnisse aus mehreren Färbungen zusammenfassen zu können, wurden die Medianwerte der Fluoreszenzintensitäten der spezifischen Färbung (CXCR3) durch diejenigen der unspezifischen Färbung (Isotyp) dividiert und als relative Fluoreszenzintensität dargestellt. Die Vorinkubation der Zellen mit I-Tac führte zu einer deutlichen Abnahme der CXCR3-Oberflächenexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb.12A). Da eine solche Herabregulierung nicht beobachtet wurde, wenn die Zellen mit dem Liganden bei 4°C inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt), beruht diese auf einer Internalisierung des Liganden/Rezeptorkomplexes. Im Gegensatz dazu veränderte keine der verwendeten PF4-Konzentrationen die CXCR3-Expression.

Im nächsten Experiment sollte nun überprüft werden, ob die Bindung von I-Tac an seinen Rezeptor und die damit verbundene Internalisierung der Liganden/Reeptorkomplexes durch PF4 beeinflusst wird. Hierzu wurden T-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von I-Tac alleine oder in Kombination mit 4  $\mu$ M PF4 für 10 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend die CXCR3-Expression auf den T-Zellen nachgewiesen. In Abbildung 12B dargestellt, reduzierte die Vorinkubation der Zellen sowohl mit I-Tac allein als auch die I-Tac/PF4-Koinkubation die CXCR3-Expression in gleichem Maße. Damit konnte gezeigt werden, dass PF4 weder die Expression von CXCR3 noch die von I-Tac vermittelte Internalisierung des Rezeptors moduliert.



Abbildung 12: Effekt von PF4 auf die Oberflächenexpression von CXCR3 und dessen Interaktion mit I-Tac. T-Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>) wurden mit ansteigenden Konzentrationen an I-Tac (•) oder PF4 (°) für 10 min bei 37°C inkubiert (A). Alternativ erfolgte eine Vorinkubation mit I-Tac allein (■) oder I-Tac in Kombination mit PF4 (□) für 10 min bei 37°C (B). In allen Ansätzen dienten Zellen ohne Inkubation mit I-Tac oder PF4 als Kontrolle. Durch Bindung des monoklonalen Antikörpers anti-CXCR3 wurde in der Durchflusszytometrie die CXCR3-Expression auf der Oberfläche bestimmt. Färbungen mit einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps dienten als Negativkontrollen. Weder die Inkubation mit I-Tac oder PF4 noch mit der Kombination der beiden Chemokine hatten einen Einfluss auf die Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt).

Aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten sind Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der relativen Fluoreszenzintensität, welche aus dem Quotienten des Medians der Fluoreszenzintensität von der spezifischen Färbung und der Isotyp-Kontrolle errechnet wurde, dargestellt.

# 3.4.2 Der I-Tac-induzierte intrazelluläre Anstieg der Kalziumkonzentration wird durch PF4 nicht gehemmt

Ein sehr frühes Signal von G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten heptahelikalen Rezeptoren ist die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (25), welche für die Signalweiterleitung einer Vielzahl zellulärer Funktionen essentiell ist. Da diese Eigenschaft auch für den CXCR3 beschrieben ist (22), sollte ein potentiell modulatorischer Einfluss von PF4 auf diese Funktion untersucht werden. Hierzu wurden  $10 \times 10^6$  T-Zellblasten in An- und Abwesenheit von PF4 (4  $\mu$ M) für 5 min bei 37° C vorinkubiert, nachfolgend mit 10 nM I-Tac oder PF4 (4  $\mu$ M) oder einer Kombination aus 10 nM I-Tac und 4  $\mu$ M PF4 stimuliert und Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration bestimmt. Wie erwartet kam es nach Zugabe von I-Tac zu einem raschen Anstieg der Kalziumkonzentration, welche ungefähr 30 Sekunden auf maximalem Niveau blieb und dann wieder abnahm (Abb. 13A). PF4 allein löste keine Kalziumfreisetzung aus (Abb.13B). Eine Vorinkubation der Zellen mit PF4 (Abb.13D) sowie eine Koinkubation von I-Tac mit PF4 (Abb.13C) hatten keinen Einfluss auf die I-Tac-induzierte Erhöhung der Kalziumkonzentration.

Diesen Daten zeigen, dass die PF4-vermittelte Hemmung der Chemotaxis nicht auf eine verminderte Freisetzung von Kalzium zurückzuführen ist. Weiterhin lassen diese Befunde darauf schließen, dass der Angriffspunkt dieser Hemmung unterhalb des CXCR3 und dessen G-Protein liegen muss.



Abbildung 13: Effekt von PF4 auf den I-Tac-induzierten Anstieg der intrazellulären freien Kalziumkonzentration. T-Zellblasten ( $10 \times 10^6$ ) verblieben unstimuliert (A, B und C) oder wurden mit 4  $\mu$ M PF4 (D) für 5 min bei 37° C vorinkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 10 nM I-Tac (A und D) oder 4  $\mu$ M PF4 (B) oder einer Kombination aus 10 nM I-Tac und 4  $\mu$ M PF4 (C) stimuliert und die intrazelluläre Kalziumkonzentration bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei durchgeführten Experimenten mit prinzipiell gleichen Daten ist gezeigt.

# 3.4.3 Beteiligung von cAMP bei der Inhibition der I-Tac-induzierten Chemotaxis

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein "second messenger", welcher in Leukozyten eine Vielzahl von inhibitorischen Funktionen vermittelt. Während cAMP aus ATP durch Aktivierung des Enzyms Adenylat-Cyclase gebildet wird, katalysiert seinen Abbau die cAMP-spezifische Phosphodiesterase. cAMP ist in der Lage unter anderem über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) Signale weiterzuleiten. Interessanterweise konnten Hidi *et al.* zeigen, dass cAMP eine Inhibition der PAF- oder IL-8-induzierten T-Zellchemotaxis hervorruft (84).

Zunächst sollte geprüft werden, ob cAMP grundsätzlich in der Lage ist, die I-Tac-induzierte Chemotaxis zu modulieren.

Hierzu wurden T-Zellen ( $2x10^6$ /ml) für 10 min mit dem membranpermeablen cAMP-Analog Dibutyryl-cAMP (db-cAMP; 800 nM) und dem cGMP-Analog Dibutyryl-cGMP (db-cGMP; 800 nM) bei 37°C inkubiert oder verblieben unbehandelt und wurden für den Chemotaxis-Assay eingesetzt. Dabei enthielt die untere Kammer verschiedene Konzentrationen an I-Tac, während sich T-Zellen (0,1  $x10^6$ /Ansatz) in An- und Abwesenheit von PF4 (4  $\mu$ M) in der oberen Kammer befanden.

Die Inkubation der Zellen mit PF4 führte sowohl bei 1 nM als auch bei 10 nM I-Tac zu einer signifikanten Reduktion der Chemotaxis (Abb.14A). Die Anwesenheit von db-cAMP führte bei 1 nM und auch bei 10 nM I-Tac zu einer drastischen Reduktion an wandernden Zellen. Hingegen hatte die Kontrolle mit db-cGMP bei keiner der verwendeten I-Tac-Konzentrationen einen Effekt auf die Anzahl an wandernden Zellen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ein hoher cAMP-Spiegel in den T-Zellen zu einer vollständigen Blockade der I-Tac-induzierten Chemotaxis führt.

Im Weiteren war nun aufzuklären, ob Proteine aus dem cAMP-Metabolismus am PF4-Effekt auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis beteiligt sind.

Hierzu wurde der Einfluss des Inhibitors der Phosphodiestrease Ro20-1724 (10  $\mu$ M) und der Inhibitor der Proteinkinase A KT-5720 (1  $\mu$ M) auf den inhibitorischen PF4-Effekt untersucht. Der Hypothese folgend, dass PF4 einen intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration induziert, würde entstandenes cAMP durch den Einsatz des Inhibitors der Phosphodiesterase akkumulieren und den inhibitorischen Effekt verstärken. Im Gegensatz dazu bewirkt der Inhibitor der PKA die Signalunterbrechung des cAMP, welches somit den PF4-Effekt aufheben müsste. Nach einer 20-minütigen Vorinkubation der Zellen mit den Inhibitoren, wurden die Zellen im Chemotaxis-Assay verwendet. Während PF4 die I-Tac-induzierte Chemotaxis hemmte, hatten die beiden Inhibitoren weder einen Einfluss auf die I-Tac-vermittelte Chemotaxis noch auf die durch PF4 induzierte Hemmung dieser Zellfunktion (Abb.14B und C).



Abbildung 14: Die Rolle von cAMP in der I-Tac-induzierten Chemotaxis. T-Zellen  $(2x10^6/ml)$  wurden für 10 min mit Dibutyryl-cAMP (db-cAMP; 800 nM), Dibutyryl-cGMP (db-cGMP; 800 nM) (A) oder für 20 min mit Ro20-1724 (Ro20; 10  $\mu$ M; B) bzw. mit KT-5720 (1  $\mu$ M; C) inkubiert während entsprechende Kontrollen unbehandelt blieben. Anschließend wurde die Migration der Zellen (0,1  $x10^6$ ) gegenüber 1 nM und 10 nM I-Tac bestimmt. In Parallelansätzen wurde zusätzlich 4  $\mu$ M PF4 zu den Zellen gegeben. Dargestellt sind Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der Ergebnisse von drei (C) bzw. vier (A und B) unabhängig durchgeführten Experimenten. \* zeigt statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen stimulierten und unstimulierten Ansätzen.

Abschließend wurde direkt die intrazelluläre cAMP-Konzentration in T-Zellen nach deren Stimulation mit PF4 bestimmt. Hierzu wurden T-Zellen  $(2x10^7/Ansatz)$  für eine Minute und fünf, zehn und 30 Minuten mit PF4 (4 µM) stimuliert oder verbleiben unstimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Menge an intrazellulärem cAMP bestimmt. Als Positivkontrolle wurde Forskolin verwendet, welches direkt die Adenylatzyklase aktiviert.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, führte die Stimulation mit Forskolin zu einem schnellen Anstieg des cAMP-Signals, welches nach fünf Minuten wieder absank und nach 30 min nahezu Ausgangsniveau erreichte. Die Stimulation mit PF4 hingegen bewirkte keinerlei Anstieg der cAMP-Konzentration.

Obwohl hohe cAMP-Spiegel prinzipiell zu einer Blockade der I-Tac-vermittelten Chemotaxis führen können, schließen sowohl die Experimente mit den verwendeten Inhibitoren als auch die direkte Bestimmung eine Beteiligung von cAMP bei der PF4-vermittelten Inhibition der I-Tac-induzierten Chemotaxis aus.



Abbildung 15: Effekt von PF4 auf die Induktion von cAMP. T-Zellen  $(2x10^7/\text{Ansatz})$  wurden für eine Minute und fünf, zehn und 30 Minuten mit PF4  $(4 \,\mu\text{M}; \circ)$  oder Forskolin  $(10 \,\mu\text{M}; \bullet)$  stimuliert oder verbleiben unstimuliert (•). Nach der Lyse der Zellen wurde mithilfe eines ELISA die Menge an intrazellulärem cAMP bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

# 3.4.4 Sphingosin-1-phosphat ist nicht an der PF4-Signalweiterleitung beteiligt

Für Sphingosin-1-phosphat, das Produkt der Sphingosinkinase, wurden vielerlei Funktionen zum Beispiel bei der Induktion von Zellproliferation oder der Zellmigration beschrieben. Dabei kann Sphingosin-1-phosphat entweder als exogener Stimulus an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden oder als intrazellulärer Mediator fungieren (85). Interessanterweise hemmt Sphingosin-1-phosphat die RANTES-induzierte Chemotaxis von T-Zellen (86). In meiner Arbeitsgruppe konnte nun gezeigt werden, dass PF4 in Monozyten die Sphingosinkinase aktiviert und das entstehende Sphingosin-1-phosphat eine Reihe wichtiger Zellfunktionen induziert (B.Kasper, unpublizierte Daten). Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte geklärt werden, ob die Aktivierung der Sphingosinkinase bei der PF4-vermittelte Inhibition der Chemotaxis ebenfalls eine Rolle spielt. Hierzu wurden T-Zellen (2 x10<sup>6</sup>/ml) in An- und Abwesenheit des Sphingosinkinase-Inhibitors (SKI; 10  $\mu$ M) für 20 min bei 37°C vorinkubiert und nachfolgend die Chemotaxis gegenüber I-Tac bestimmt.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, hatte der Inhibitor sowohl auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis an sich als auch auf den hemmenden Effekt von PF4 keinen Einfluss. Somit musste auch Sphingosin-1-phosphat als Mediator der PF4-vermittelten Inhibition der Chemotaxis ausgeschlossen werden.

# 3.4.5 Untersuchung von intrazellulären Signalmolekülen der I-Tac-vermittelte Chemotaxis

Um mögliche Angriffspunkte der PF4-vermittelten Inhibition in der I-Tac-induzierten Signalskaskade aufzuklären, wurde zunächst versucht, die an der Chemotaxis beteiligten Signalelemente zu identifizieren. Dazu wurden T-Zellen (2 x10<sup>6</sup>/ml) für 20 min mit den Inhibitoren JNK-Inhibitor II (5  $\mu$ M), PP2 (25  $\mu$ M), PD098059 (40  $\mu$ M), SB203580 (25  $\mu$ M), SU6656 (5  $\mu$ M), Y-27632 (5  $\mu$ M), Manumycin A (15  $\mu$ M) und Wortmannin (10 nM) bei 37°C inkubiert und anschließend im Chemotaxis-Assay die Wanderung auf 10 nM I-Tac überprüft.



Abbildung 16: Effekt des Sphingosinkinase-Inhibitors (SKI) auf die PF4-induzierte Hemmung der Chemotaxis. T-Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden mit SKI ( $10 \mu$ M) für 20 min bei 37°C inkubiert oder verblieben unbehandelt. Anschließend wurde die Migration der Zellen ( $0,1 \times 10^6$ ) in An- und Abwesenheit von PF4 ( $4 \mu$ M) gegenüber 10 nM I-Tac ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der Daten dreier unabhängiger Experimente.

Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, denen kein Inhibitor oder eine entsprechende Menge an Lösungsmitteln der Inhibitoren zugesetzt wurde. Wie in Abbildung 17 dargestellt, inhibierte der Ras-Inhibitor Manumycin vollständig und der ROCK-Inhibitor Y-27632 partiell die gerichtete Wanderung der T-Zellen auf 10 nM I-Tac. Überraschenderweise hatten Inhibitoren gegen JNK, Hck, p38, PI3-Kinase, MEK und Lyn keinen Einfluss auf die Anzahl an migrierten Zellen und spielen somit keine prominente Rolle in der I-Tac-vermittelten Chemotaxis. Da die partielle Inhibition von ROCK für eine eher untergeordnete Rolle bei der gerichteten Wanderung von T-Zellen spricht, wurden die folgenden Untersuchungen auf die Rolle von Ras beschränkt.



Abbildung 17: Effekt von Inhibitoren verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis. T-Zellen (2 x10<sup>6</sup>/ml) wurden für 20 min mit den Inhibitoren JNK-Inhibitor II (5  $\mu$ M), PP2 (25  $\mu$ M), PD098059 (40  $\mu$ M), SB203580 (25  $\mu$ M), SU6656 (5  $\mu$ M), Y-27632 (5  $\mu$ M), Manumycin A (15  $\mu$ M) oder Wortmannin (10 nM) bei 37°C inkubiert oder die Zellen verblieben unbehandelt. Anschließend wurde die Migration der Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) gegenüber 10 nM I-Tac ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Ergebnisse von vier unabhängig durchgeführten Experimenten. \* zeigt statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen Ansätzen mit und ohne Inhibitor.

Um die Spezifität der Hemmung durch Manumycin zu prüfen, wurde die Wirkung des Inhibitors in Abhängigkeit von seiner Konzentration untersucht. Dazu wurden T-Zellen (2 x10<sup>6</sup>/ml) mit ansteigenden Konzentrationen an Manumycin für 20 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend im Chemotaxis-Assay die Migration gegenüber I-Tac bestimmt. Als Kontrolle dienten T-Zellen, denen kein Inhibitor oder eine entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO zugesetzt worden war.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, kam es bereits bei der niedrigsten verwendeten Konzentration an Ras-Inhibitor zu einer Abnahme an wandernden Zellen. Steigende Ras-Inhibitorkonzentrationen führten zur weiteren Abnahme an wandernden Zellen bis zur vollständigen Inhibition der Chemotaxis. Es zeigte sich eine klare dosisabhängige Inhibition.



Abbildung 18: Effekt des Ras-Inhibitors Manumycin A auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis. T-Zellen  $(2 \times 10^6/\text{ml})$  wurden für 20 min mit ansteigenden Konzentrationen an Manumycin A versetzt und nachfolgend in einer Konzentration von  $0,1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz in die obere Kammer einer 48-Well-Chemotaxiskammer gegeben. In der unteren Kammer befand sich Medium allein oder 10 nM I-Tac und nach 150 min wurde die Anzahl an migrierten Zellen ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen der Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

## 3.4.6 PF4 steigert die I-Tac-induzierte Menge an membranassoziiertem Ras

Die monomere GTPase Ras ist als wichtiges Signalmolekül bei der Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptorkomplex beschrieben (87). Darüber hinaus spielt Ras eine wichtige Rolle in der Induktion von Zellfunktionen wie Adhärenz oder Chemotaxis (88,89) von Immunzellen. Da der Ras-Inhibitor zu einer kompletten Blockierung der I-Tac-induzierten Chemotaxis führte, war es nun von Interesse, ob PF4 in der Lage ist, die Aktivität von Ras zu beeinflussen. Ras und andere monomere GTPasen müssen für ihre Aktivierung mit Zellmembranen assoziiert sein. Die Menge der membranassoziierten GTPase kann dabei als grobes Maß für die Menge an aktiviertem Enzym gelten. Die membrangebundene Form von Ras wurde nach immunozytometrischer Färbung mit einem gegen Ras gerichteten Antikörper im konfokalen Laserscanning-Mikroskop bestimmt.

Hierzu wurden T-Zellen (2 x $10^6$ /ml) für 5 min mit PF4 (4  $\mu$ M) inkubiert oder verblieben ohne PF4 und wurden nachfolgend für 15 Minuten mit I-Tac (10 nM) stimuliert, während

entsprechende Kontrollen keinen Stimulus erhielten. Nach Fixierung und Herstellung von Objektträgerpräparaten, wurde Ras in den Zellen mittels immunzytochemischer Färbung in der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie sichtbar gemacht.

In Abbildung 19 sind in der linken Spalte die Färbungen mit einem Antikörper gegen Ras (C, E, G und I) und die Färbung mit einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps (A) dargestellt (grün) und in der rechten Spalte zusätzlich als Kernfärbung TOTO-3 (rot). Eine Färbung von Ras an der Membran der Zellen konnte in allen vier Stimulationsansätzen nachgewiesen werden, während die Färbung mit dem irrelevanten Antikörper keine Färbung zeigte (hier nur der unstimulierte Ansatz in Abb.21A und B dargestellt). Während die Stimulation mit I-Tac (G und H) eine schwache Steigerung der Membranfärbung bewirkte, veränderte die Anwesenheit von PF4 (E und F) die bei unstimulierten aktivierten T-Zellen bestehende Membranfärbung nicht (C und D). Die Kombination der beiden Stimuli allerdings führte überraschenderweise zu einer deutlichen Verstärkung der Membranfärbung (I und J) und nicht zu der vermuteten Inhibition.

Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass PF4 die Aktivität von Ras modulieren kann. Auf welche Weise eine erhöhte Ras-Aktivität die T-Zellchemotaxis beeinflussen kann ist jedoch spekulativ und wird im nachfolgenden Abschnitt "4. Diskussion" ausführlich erörtert.



Abbildung 19: Nachweis von membranassoziiertem Ras in I-Tac- und PF4-stimulierten **T-Zellen.** T-Zellen (2 x10<sup>6</sup>/ml) wurden für 5 min in An- und Abwesenheit von PF4 (4  $\mu$ M) vorinkubiert und nachfolgend mit I-Tac (10 nM) stimuliert oder verblieben unstimuliert. Nach und Herstellung Fixierung von Objektträgerpräparaten wurde Ras mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper anti-Ras sind in Abbildung C-J dargestellt, die Färbungen mit einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps in Abbildung A und B. Die Zellkerne (TOTO-3) erscheinen in rot. Weder die Vorinkubation mit PF4 noch die Stimulation mit I-Tac hatte einen Einfluss auf die Isotypkontrolle (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie erstellt. Sie zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes von drei unabhängigen Experimenten mit prinzipiell gleichem Ergebnis.

# 3.5 Untersuchungen zur CXCR3-unabhängigen Chemotaxis

Aus den bisherigen Ergebnissen ist zu schließen, dass PF4 seine biologische Aktivität unabhängig vom CXCR3 über einen eigenständigen Rezeptor vermittelt. Daher wäre es möglich, dass die Kapazität von PF4 zur Inhibition der Chemotaxis weder auf die CXCR3-vermittelte Antwort noch auf T-Zellen beschränkt ist.

# **3.5.1** PF4 hemmt die SDF1-α-induzierte Chemotaxis

In einem ersten Ansatz sollte geklärt werden, ob PF4 eine Chemotaxis in T-Zellen hemmt, die unabhängig vom CXCR3 induziert wird.

Hierzu wurde das Chemokin SDF1- $\alpha$  (*Stromal cell-derived Factor1-\alpha*, CXCL12) gewählt, welches an den Rezeptor CXCR4 bindet, der auf vielen T-Zellpopulationen exprimiert ist und durch PHA und IL-2-Stimulation heraufreguliert wird (90).

Für diesen Ansatz wurden T-Zellen in An- und Abwesenheit von PF4 (4  $\mu$ M) in die obere Kammer gefüllt und deren Wanderung gegen ansteigende Konzentrationen von SDF1- $\alpha$  bestimmt.

Wie in Abb. 20 dargestellt, erwies sich SDF1- $\alpha$  als starker Induktor einer T-Zellchemotaxis. In Konzentrationen von 0,1 nM bis 10 nM SDF1- $\alpha$  kam es zu einer Steigerung der Chemotaxis, während bei höheren Konzentrationen an SDF1- $\alpha$  die Anzahl an gewanderten Zellen wieder absank. Die Zugabe von PF4 zu den T-Zellen bewirkte bei jeder Konzentration von SDF1- $\alpha$  eine deutliche Verringerung der Zahl an migrierenden Zellen. Während bei

0,1 nM, 0,3 nM und 300 nM SDF1- $\alpha$  20-30 % Inhibition im Vergleich zur Kontrolle durch PF4 induziert wurden, waren es bei den Konzentrationen 1 nM bis 30 nM 35-40 % Inhibition. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die PF4-vermittelte Inhibition der T-Zellchemotaxis nicht auf biologische Antworten, die durch den CXCR3 induziert werden, beschränkt ist.



Abbildung 20: Einfluss von PF4 auf die SDF1- $\alpha$ -induzierte Chemotaxis humaner T-Zellen. Aufsteigende Konzentrationen von SDF1- $\alpha$  bzw. Medium allein (gestrichelte Linie) wurden in die unteren Kompartimente einer 48-Well Chemotaxiskammer nach Boyden gegeben und die Migration von T-Zellen (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) aus dem oberen in das untere Kompartiment bestimmt (•). In Parallelansätzen wurde zusätzlich 4 µM PF4 in die oberen Kompartimente zu den Zellen gegeben ( $\circ$ ). Nach 150 min wurde die Anzahl an migrierten Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen aus Ergebnissen von vier unabhängig durchgeführten Experimenten. \* zeigt statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen Ansätzen mit und ohne PF4.

# 3.5.2 Einfluss von PF4 auf die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten

Aus den vorangegangenen Experimenten ergab sich ein Bild von PF4 als ein Inhibitor der T-Zell-Chemotaxis, dessen Wirkung nicht auf einen bestimmten Stimulus beschränkt ist. Von großem Interesse war nun, ob PF4 vergleichbare Effekte auch in anderen Zellpopulationen des Immunsystems bewirken kann. Hierzu wurden neutrophile Granulozyten, welche die ersten Zellen sind die in ein infiziertes Gewebe einwandern, ausgewählt. Als chemotaktische Stimuli wurden das Neutrophile-aktivierendes Peptid 2 (NAP-2) und das bereits bei T-Zellen untersuchte SDF1- $\alpha$  verwendet. NAP-2 bindet an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 (77), welche auf allen neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, während SDF1- $\alpha$  an den CXCR4 bindet, der nur auf älteren Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird (91). In Vorexperimenten hatte sich gezeigt, dass frisch isolierte neutrophile Granulozyten in der Lage waren, chemotaktisch auf NAP-2, nicht jedoch auf SDF1- $\alpha$  zu antworten. Andererseits ließ
sich nach 22 h Kultur die Migration der Granulozyten durch SDF1- $\alpha$ , nicht jedoch NAP-2 induzieren.

Im ersten Ansatz wurde daher die obere Kammer mit frisch präparierten neutrophilen Granulozyten (0,1 x $10^6$ /Ansatz) in An- und Abwesenheit von PF4 (4  $\mu$ M) befüllt, während sich in der unteren Kammer ansteigende Konzentrationen von NAP-2 befanden. Nach einer Stunde wurde der Assay gestoppt und die Anzahl der in die untere Kammer gewanderten Zellen bestimmt.

In Abbildung 21 A dargestellt, zeigte sich bei NAP-2 nicht der für Chemokine typische Verlauf einer Optimumskurve, sondern ein stetiger Anstieg der Zellwanderung mit ansteigender NAP-2-Konzentration ohne ein Maximum zu erreichen. Dieses Phänomen wurde bereits von Ludwig *et al.* beschrieben und lässt sich durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlich affinen Rezeptoren erklären (77). Während der CXCR2 NAP-2 mit hoher Affinität bindet, besitzt der CXCR1 nur eine niedrige Affinität für dieses Chemokin. Bei den hier eingesetzten Konzentrationen kommt es damit noch nicht zu einer Sättigung des CXCR1. Wurden die Zellen mit PF4 inkubiert, zeigten sich bis zu einer Konzentration von 30 nM NAP-2 keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Eine partielle Reduktion der chemotaktischen Antwort (etwa 15% Inhibition gegenüber der Kontrolle) fand ab einer Konzentration von 100 nM NAP-2 statt.

Im zweiten Ansatz wurden neutrophile Granulozyten verwendet, die 20-22 Stunden kultiviert worden sind. Dies führt zu einer Expression des CXCR4 auf der Zelloberfläche (91). In der unteren Kammer befanden sich ansteigenden Konzentrationen von SDF1- $\alpha$  und in der oberen Kammer neutrophile Granulozyten (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) in An- und Abwesenheit von PF4 (4  $\mu$ M).

Wie in Abbildung 21B dargestellt, war die Antwort auf steigende Konzentrationen an

SDF1- $\alpha$  durch eine typische Optimumskurve charakterisiert. Bereits ab einer SDF1- $\alpha$ -Konzentration von 0,3 nM war eine gerichtete Zellwanderung zu sehen, die in einem Bereich von 10 nM bis 30 nM maximal war und oberhalb von 100 nM wieder abnahm. Die Anwesenheit von 4  $\mu$ M PF4 führte ab einer Konzentration von 1 nM SDF1- $\alpha$  gegenüber der korrespondierenden Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion der Wanderung der Zellen (bis zu 40 % Inhibition).

PF4 ist somit ebenfalls in der Lage, die gerichtete Wanderung von neutrophilen Granulozyten zu modulieren.



Abbildung 21: Einfluss von PF4 auf die NAP-2- und SDF1- $\alpha$ -induzierte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten. Aufsteigende Konzentrationen von NAP-2 (A) oder SDF1- $\alpha$  (B) bzw. Medium allein (gestrichelte Linie) wurden in die unteren Kompartimente einer 48-Well Chemotaxiskammer nach Boyden gegeben und die Migration von neutrophilen Granulozyten (0,1 x10<sup>6</sup>/Ansatz) aus dem oberen in das untere Kompartiment bestimmt (•). In Parallelansätzen wurde zusätzlich 4  $\mu$ M PF4 in die oberen Kompartimente zu den Zellen gegeben ( $\circ$ ). Nach 60 min wurde die Anzahl der durch die Poren der Membran gewanderten Zellen bestimmt. Die Ergebnisse geben die Mittelwerte <u>+</u> Standardabweichungen von Daten vierer (NAP-2) bzw. dreier (SDF1- $\alpha$ ) unabhängiger Experimente wieder. \* zeigt statistisch signifikante Unterschiede (p < 0, 05) zwischen Ansätzen mit und ohne PF4.

Diese Ergebnisse belegen, dass die PF4-vermittelte Inhibition einer chemotaktischen Antwort weder auf die durch CXCR3-induzierte Chemotaxis noch auf T-Zellen allein beschränkt ist.

#### 4 Diskussion

T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle unter anderem bei der Bekämpfung von Infektionen und Tumoren und sind bei einer Vielzahl weiterer Entzündungsprozesse beteiligt. Ein entscheidender Schritt bei der Rekrutierung von Effektorzellen an den Entzündungsherd ist ihre gerichtete Wanderung entlang eines chemotaktischen Gradienten.

Chemotaxis ist ein fundamentaler zellulärer Prozess und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Homöostase von Geweben, der Wundheilung, der angeborenen Immunität und der Metastasierung von Tumorzellen. So konnte gezeigt werden, dass SDF1-α-defiziente Mäuse perinatal mit Defekten in der B-Zelllymphopoese und der Myelopoese sterben (92). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass in vielen Tumorzelllinien Chemokinrezeptoren auf hohem Niveau exprimiert werden und deren Liganden von Organen exprimiert werden, in welchen es zur Metastasierung kommt (92). In der Immunabwehr werden beispielsweise Phagozyten durch die Freisetzung von Chemokinen am Entzündungsherd zu diesem gelockt, um Pathogene zu beseitigen. Bei bakterieller Pneumonie konnte die Wichtigkeit der Anlockung von neutrophilen Granulozyten für die Beseitigung der bakteriellen Invasion nachgewiesen werden (93). Eine wichtige Rolle kommt der Chemotaxis auch bei der Rezirkulation von Lymphozyten und der gewebespezifischen Wanderung von Gedächtnisund Effektorzellen zu. So gelangen naive T-Zellen mithilfe des Chemokins SLC (secondary lymphoid tissue chemokine), welches vom hohen Gefäßendothel, von Stromazellen und dendritischen Zellen im lymphatischen Gewebe exprimiert wird, ins Lymphgewebe. Bei einer akuten Entzündung müssen im Lymphknoten aktivierte T-Zellen, wie CD4-T<sub>H</sub>1-Effektorzellen, diesen verlassen und zum Infektionsherd wandern, um dort beispielsweise Makrophagen aktivieren zu können (2). Eine Vielzahl an Mediatoren ist bekannt, welche in der Lage sind, eine gerichtete Wanderung auszulösen, wie das bakterielle Peptide fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), die Komplementfaktoren C3a und C5a und die große Familie der Chemokine. Die Kontrolle der Chemotaxis ist von entscheidender Bedeutung und Fehlfunktionen führen hier zu schweren Schäden und Erkrankungen wie die Ausbildung von Metastasen oder Entwicklungsstörungen von Organen. Der großen Anzahl an Induktoren von chemotaktischen Antworten stehen aber interessanterweise kaum Inhibitoren oder Regulatoren der Chemotaxis gegenüber. Man vermutet daher, dass die Wanderung der Zellen über die Konzentrationen der Chemotaxine selbst reguliert wird. Während in niedrigen Konzentrationen des Mediators eine Migration ausgelöst wird, sind höhere Konzentrationen dazu nicht mehr in der Lage und beenden somit die Wanderung der Zellen am Entstehungsort der Chemotaxis, wo die höchste Konzentration vorliegt. Gerade am Beginn von Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise bei einer akuten Verletzung der Vaskulatur, werden aber wahrscheinlich solche hohen Konzentrationen der Chemotaxine nicht erreicht werden. In einem solchen Szenario sind dann weitere Regulatoren erforderlich, welche die Chemotaxis kontrollieren können.

Die in meiner Arbeit gezeigte Inhibition der Chemotaxis durch PF4 könnte einen neuen Regulationsmechanismus in der gerichteten Migration darstellen. Ich konnte zeigen, dass das thrombozytäre Chemokin PF4 die Chemotaxis von T-Zellen auf I-Tac, MIG und zu einem geringeren Anteil auch die IP-10-induzierte Chemotaxis zu hemmen vermag. Der inhibitorische Effekt von PF4 auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis wird weder über die beiden bekannten PF4-Rezeptoren CXCR3B oder den Proteoglykan-Rezeptor vermittelt, noch kommt es zu einer verminderten Bindung von I-Tac an seinen Rezeptor CXCR3. Die Untersuchungen der intrazellulären Signalwege ergaben die Abhängigkeit der I-Tac-induzierten Chemotaxis von der kleinen GTPase Ras und eine Erhöhung der bereits konstitutiv hohen Ras-Aktivität durch Kostimulation der T-Zellen mit I-Tac und PF4. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass PF4 auch die SDF1-α-induzierte Chemotaxis sowohl von T-Zellen als auch von neutrophilen Granulozyten hemmt.

Zu Beginn meiner Arbeit war bekannt, dass PF4 einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation und die IFN- $\gamma$ - und IL-2-Ausschüttung von T-Zellen hat (61). Dieser Effekt wurde auf T-Zellen nach deren antigener oder polyklonalen Stimulation nachgewiesen. Während Liu *et al.* von einer generellen Inhibition der Zytokinausschüttung berichten (74), die unter anderen IL-2, IL-4 und IL-5 betreffen, konnten Romagnani *et al.* zwar eine verminderte Freisetzung von IL-2 und INF- $\gamma$ , jedoch eine erhöhte Ausschüttung der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zeigen (75). Interessanterweise steigert PF4 die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorischen T-Zellen. Dies geht allerdings mit dem Verlust ihrer Fähigkeit das Wachstum von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen zu hemmen einher (74).

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass PF4 nicht nur auf langfristige Funktionen von T-Zellen einwirkt, sondern auch in der Lage ist kurzfristige Immunantworten von T-Zellen zu hemmen.

Die Modulation von schnellen Funktionen durch PF4 auf Granulozyten und Monozyten ist schon seit längerem bekannt. So konnte in meiner Arbeitsgruppe beispielsweise PF4 als starker Induktor der Adhärenz von neutrophilen Granulozyten und der Phagozytose in Monozyten ermittelt werden (67,94). Erste Experimente dieser Arbeit zeigten, dass PF4 die I-Tac-induzierte Chemotaxis reduziert (Abb.1). Dieser Effekt trat ab einer Konzentration von

3 nM I-Tac auf, wenn PF4 sich zusammen mit dem Stimulus in der unteren Chemotaxiskammer befand. Erfolgte jedoch die Zugabe von PF4 zu den Zellen in das obere Kompartiment, war bereits ein inhibitorischer Effekt von PF4 bei der gerinsten hier verwendeten I-Tac-Konzentration von 0,3 nM sichtbar. Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit dieses Phänomens ergaben, dass der PF4-Effekt dosisabhängig ist und bereits bei einer Konzentration von 0,5 µM PF4 einsetzt und sich bis 8 µM weiter steigern lässt (Abb.2). Ein ähnlicher Wirkungsbereich konnte auch in der Hemmung der T-Zellproliferation nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 0,5 µM kam es zu einer leichten Hemmung, welche ab 1 nM PF4 signifikant war (61). Auch die Funktionen, die PF4 in neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermittelt, lassen sich in diesem Konzentrationsbereich  $(0,5 \mu M - 4 \mu M)$  induzieren (68,94).

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass der modulatorische Einfluss von PF4 nicht auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis beschränkt ist, sondern sich in vergleichbarem Ausmaß auch die MIG-induzierte Chemotaxis reduziert (Abb.4A und B). Wurde die Migration der Zellen durch IP-10, den dritten CXCR3-Liganden, vermittelt, so wurde eine geringe Hemmung bei Koinkubation der Chemokine in der unteren Kammer nachgewiesen, während bei Zugabe von PF4 in die obere Kammer keine Inhibition auftrat (Abb.4C und D). Dies Ergebnis erscheint überraschend, da sich IP-10 und MIG an einen gemeinsamen Rezeptor binden und sich funktionell nur hinsichtlich ihrer Effizienz und Potenz unterscheiden (21,40). IP-10 war der schwächste Induktor von den getesteten CXCR3-Liganden und es ist daher denkbar, dass der PF4-Effekt erst ab einer minimale Aktivität auftritt, die bei der IP-10-vermittelten Chemotaxis nicht erreicht wird.

Interessanterweise wurde beschrieben, dass I-Tac, IP-10 und MIG ebenfalls die Chemotaxis bestimmter T-Zellpopulationen hemmen können. Während sie in für  $T_H$ 1-Zellen die Migration induzieren, inhibieren sie die CCR3-vermittelte Chemotaxis in  $T_H$ 2-Zellen. Die Hemmung beruht dabei auf einer Kompetition der CXCR3-Liganden mit Eotaxin um die Bindung an den CCR3. Keiner der CXCR3-Liganden induziert nach Bindung an den CCR3 eine Internalisierung, welches auf die antagonistische Eigenschaft hinweist (95). Ein weiterer Regulationsmechanismus der Chemotaxis wurde von Hecht *et al.* beschrieben. Während einzeln eingesetzt die Chemokine SDF1- $\alpha$ , RANTES und MIP-1 $\beta$  die Migration von T-Zellen induzierten, kam es bei deren Kombination zu einer deutlichen Reduzierung der Wanderung. Als Mechanismus vermuten die Autoren eine heterologe Desensitivierung über intrazelluläre Signalmoleküle (96). Interessanterweise werden diese beschriebenen inhibitorischen Fähigkeiten von Mediatoren induziert, welche prinzipiell auch in der Lage sind Chemotaxis zu vermitteln. Da im Unterschied dazu der von mir beschriebene inhibitorische Mediator PF4 nicht chemotaktisch wirkt, könnte dieser Inhibition ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen.

Grundsätzlich sind drei mögliche Mechanismen denkbar, über welche PF4 die Chemotaxis inhibiert. Erstens könnte es sich um ein rezeptorunabhängiges Phänomen handeln, beispielsweise durch Abbau des Liganden. Zweitens könnte PF4 Präsenz oder Bindungsverhalten des aktivierenden Rezeptors verändern oder, drittens, inhibitorische Signale über einen eigenständigen deaktivierenden Rezeptor vermitteln. Allen drei Möglichkeiten wurden in dieser Arbeit systematisch nachgegangen.

Als eine rezeptorunabhängige Regulation käme neben einer Heterooligomerisierung zu inaktiven Komplexen auch eine Proteolyse des Stimulus in Frage. Es ist bekannt, dass Chemokine in der Regel nicht als Monomere vorliegen, sondern als Dimere oder als Oligomere noch höherer Ordnung (11). Die Oligomerisierung ist oft für die Aktivität der Chemokine *in vivo* notwendig. So konnten Proudfoot *et al.* zeigen, dass monomere Mutanten von MCP-1, MIP-1β und RANTES zwar in vitro aktiv, in vivo aber inaktiv sind (97). Da nur eine limitierte Auswahl der in Chemokinunterklassen konservierten Dimerisierungsmotiven vorliegt, kann es auch zur Heterooligomerisierung kommen. Diese wurde unter anderem für die Chemokine MCP-1 mit MCP-2 (98) und SLC mit BCA-1 (B-cell attracting chemokine-1) (99) gezeigt, wobei die Anwesenheit von BCA-1 die chemotaktische Aktivität von SLC deutlich steigerte. PF4 bildet in niedrigen Konzentrationen Dimere aus, bei höheren Konzentrationen liegt PF4 allerdings überwiegend als Tetramer vor (56). Da auf T-Zellen erst ab einer Konzentration von 0,25 µM PF4 eine Bindung nachweisbar war (Abb.5), könnte hier auch die tetramere Form für die Bindung relevant sein. Für PF4 sind auch Interaktionen mit anderen Zyto- und Chemokinen beschrieben. In murinen mikrovaskulären Endothelzellen verhindert PF4 die Bindung des Wachstumsfaktors FGF-2 (Fibroblastenwachstumsfaktor 2) an seinen Rezeptor und somit die Proliferation der Zellen. PF4 interagiert dabei mit FGF-2 über eine Komplexbildung, welche die Homodimerisierung des FGF-2, die Bindung an seinen Rezeptor und dessen Internalisierung verhindert (100). Dudek et al. konnten zeigen, dass PF4 IL-8 mit hoher Affinität bindet, was zu einer Inhibition des IL-8-Signales in CD34<sup>+</sup>hämatopoetischen Stammzellen führt (101). Interessanterweise blockiert PF4 die IL-8induzierte Adhärenz von Monozyten an Endothelzellen, während die RANTES-induzierten Adhärenz erhöht wird (102). Von Hundelshausen et al. konnten zeigen, dass die Heterooligomerisierung von RANTES und PF4 zu einer vermehrten PF4-Bindung auf Monozyten führt. Auch für IP-10 wurde eine Interaktion mit PF4 nachgewiesen, wobei PF4

auf der B-Zelllinie A 20 die Bindung von IP-10 reduzierte (103). Da über eine mögliche Oligomerisierung von I-Tac mit PF4 keine Daten vorlagen, wurde der Einfluss von PF4 auf die Bindung von I-Tac an den CXCR3 untersucht. Da sich die Bindung von I-Tac an den CXCR3 und dessen Internalisierung nicht durch die Koinkubation mit PF4 hemmen ließ (Abb.12B), lässt sich vermuten, dass es entweder zu keiner Interaktion zwischen den Chemokinen kam oder aber diese keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von I-Tac an den CXCR3 hatte. Weiterhin spricht die Beobachtung, dass die PF4-vermittelte Inhibition stärker war, wenn PF4 in der oberen Kammer bei den Zellen platziert wurde als bei Zugabe chemotaktischen Stimulus. eher für einen zellvermittelten als zum durch Heterooligomerisierung bewirkten Effekt (Abb.1).

Es konnten von Ludwig *et al.* gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von I-Tac durch die Dipeptidyl Peptidase IV zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität führt, jedoch eine geringe Bindungskapazität an den CXCR3 bestehen bleibt. Die verkürzte Form des I-Tac ist in der Lage, den CXCR3 zu desensitivieren und somit die Chemotaxis auf intaktes I-Tac zu vermindern (81). Für PF4 ist weiterhin bekannt, dass es die katalytische Eigenschaft von Enzymen beeinflussen kann (104). Allerdings hatte ein Inhibitor der Dipeptidyl Peptidase IV keinen Einfluss auf die PF4-Inhibition der I-Tac induzierten Chemotaxis (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin spricht auch die unveränderte Fähigkeit von I-Tac, in Anwesenheit von PF4 einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zu induzieren (Abb.13), gegen die Bildung von inaktiven Heterooligomeren oder proteolytisch verändertem I-Tac und für eine zellvermittelte Wirkung des PF4.

Ein Beispiel für die zweite hypothetische Möglichkeit den aktivierenden Rezeptor, der für die Signalweiterleitung des chemotaktischen Stimulus verantwortlich ist, zu regulieren, ist die inhibitorische Wirkung von Eotaxin. Nach der Vorbehandlung von Monozyten mit Eotaxin ist deren Responsivität gegenüber MCP-1 herabgesetzt. Eotaxin kompetiert hier mit MCP-1 um die Bindung an den CCR2 und agiert somit als Antagonist, da es selbst keine funktionelle Aktivierung des Rezeptors auszulösen vermag. Darüber hinaus konnte auch eine Inhibition des RANTES oder MIP-1 $\beta$ -Signales durch Eotaxin beobachten werden. In diesem Falle führte jedoch die Bindung von Eotaxin an den CCR5 zu einer Internalisierung des Rezeptors und somit zu einer Desensitivierung der Zelle (29).

PF4 hingegen war nicht in der Lage, eine Internalisierung des CXCR3 zu bewirken. Darüber hinaus blockiert PF4 auch nicht die Bindung von I-Tac an den CXCR3 und dessen nachfolgende Internalisierung (Abb.12). Weiterhin konnte ich zeigen, dass PF4 keine Einfluss

auf den I-Tac-induzierten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration hat (Abb.13). Die Induktion dieses Signals erfordert neben den geeigneten Rezeptoren die Aktivierung einer Reihe von Signalelementen wie G<sub>i</sub>-Proteinen, Phospholipase C und Inositolphosphatrezeptoren (105-107). Es ist bekannt, dass Kalzium in unterschiedlichen Zellen als "second messenger" dient. Obwohl die Rolle des intrazellulären Kalziums in der Chemotaxis kontrovers diskutiert wird (108), zeigt das Ergebnis, dass PF4 weder die Bindung von I-Tac an den CXCR3 noch dessen Aktivierbarkeit beeinflusst.

Da sowohl eine rezeptorunabhängige Regulation als auch die Regulation über den aktivierenden Rezeptor als mögliche Mechanismen der PF4-Hemmung ausgeschlossen werden können, muss der PF4-Effekt über einen eigenständigen deaktivierenden Rezeptor vermittelt werden.

Für PF4 sind bisher zwei, biochemisch und funktionell unterschiedliche Rezeptoren beschrieben. Während es sich bei dem einen Rezeptor um ein Proteoglykan handelt, stellt der zweite Rezeptor eine Spleissvariante des CXCR3 dar, die als CXCR3B bezeichnet wird.

Petersen et al. konnten die Bindung von PF4 an Proteoglykane der Chondroitinsulfat-Klasse auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten nachweisen. Der Verdau der Zellen mit dem Enzym Chondroitinase ABC führte zu einer kompletten Blockierung der PF4-Bindung (60). Für frisch isolierte T-Zellen konnte J. Fleischer ebenfalls eine Beteiligung von Proteoglykanen an der PF4-Bindung zeigen (61). In PF4-Bindungsstudien konnte ich hier für aktivierte T-Zellen ein K<sub>D</sub>-Wert von ungefähr 0,8 µM PF4 ermittelt werden (Abb.5), welcher dem vergleichbar ist, der für frische T-Zellen ermittelt wurde (~ $1 \mu$ M) (61). Wie hier gezeigt, sind auch auf aktivierten T-Zellen Chondroitinsulfate für den überwiegenden Teil der Bindung von PF4 an die Zellen verantwortlich. Durch eine Kombination von Kompetition mit freiem CSA und Verdau der Zellen mit Chondroitinase ABC zeigte sich, dass etwa 98 % der PF4-Bindung über Glukosaminoglykane verläuft, davon sind etwa 75 % Chondroitinsulfate neutrophilen Granulozyten führte die (Abb.6). In Kompetition mit löslichen Chondroitinsulfaten zu einer fast vollständigen Inhibition der PF4-Bindung der durch PF4 ermittelten Zellaktivierung. (60). Da in den untersuchten Ansätzen weder Kompetition mit freiem CSA noch der Verdau mit Chondroitinase einen Einfluss auf die PF4-vermittelte-Inhibition der Chemotaxis hatte (Abb.7 und 8), muss jedoch die Beteiligung von Proteoglykanen an der PF4-Funktion ausgeschlossen werden. Obwohl die residualen Glykosaminoglykan unabhängigen Bindungsstellen von PF4 auf aktivierten T-Zellen nur 2 % der Gesamtbindung ausmachen, sind diese mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Vermittlung des PF4-Effektes verantwortlich. Lasagni et al. beschrieben 2003 die Expression einer alternativen Splicevariante des CXCR3, den CXCR3B, auf Endothelzellen. Auf der mit CXCR3B-transfizierten Endothelzelllinie HMEC-1 (humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie-1) konnten sie neben der Bindung der bereits bekannten CXCR3-Liganden MIG, IP-10 und I-Tac auch eine Bindung von PF4 nachweisen (54). Weiterhin gelang ihnen der Nachweis von CXCR3B-mRNA in aktivierten T-Zellen. Nach meinen Ergebnissen ließ sich eine Expression von CXCR3B-mRNA bereits in unstimulierten Zellen nachweisen, die sich durch Stimulation mit PHA und IL-2 leicht erhöhen ließ (Abb.9). Eine von Lasagni gezeigte stärkere Expression von CXCR3A gegenüber CXCR3B in aktivierten T-Zellen konnte ebenfalls bestätigt werden. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass der inhibitorische Effekt von IP-10 und PF4 auf die Proliferation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen durch einen blockierenden Antikörper gegen CXCR3 deutlich reduziert wurde. Interessanterweise konnte ich mittels eines in unserer Arbeitsgruppe generierten CXCR3B-spezifischen Antikörpers nachweisen, dass in humanen T-Zellen CXCR3B intrazellulär, nicht jedoch an der Oberfläche, exprimiert ist (Abb.10). Da nur sehr wenig über die Funktion von intrazellulär exprimierten Rezeptoren bekannt ist und keine Erkenntnisse über die mögliche Aufregulierung des CXCR3B auf der Zelloberfläche vorlagen, wurden Experimente mit aktivierten murinen T-Zellen durchgeführt. Im Genom der Maus befindet sich keine alternative Spleissstelle für den CXCR3, somit lag eine natürliche Defizienz für den CXCR3B vor. Die Beobachtung, dass PF4 auch im murinen System in der Lage war, die I-Tac-induzierte Chemotaxis zu hemmen (Abb.11), schließt eindeutig eine Beteiligung des CXCR3B an der PF4-vermittelten Inhibition der T-Zellchemotaxis aus. Da die beiden bekannten PF4-Rezeptoren nicht an der PF4-vermittelten Inhibition der I-Tac-induzierten Chemotaxis beteiligt sind, muss die Präsenz eines weiteren, bisher unbekannten Rezeptors für PF4 auf aktivierten T-Zellen gefordert werden.

Chemokine sind in der Lage eine Reihe von inflammatorischen Antworten der Immunzellen zu steuern, wie deren Rekrutierung und Wanderung, aber auch Entwicklung und Funktion. Während die Inflammation eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr spielt, können unkontrollierte Reaktionen zu schwerwiegenden Krankheiten wie Atherosklerose oder Psoriasis führen. Aus diesem Grund sind entsprechende Kontrollmechanismen von entscheidender Bedeutung. Ein Molekül, welches viele Regulationsfunktionen ausübt, ist der "second messenger" cAMP. Die Proliferation einer Reihe von verschiedenen Zellen wie retinale Epithelzellen (109), glomuläre mesangiale Zellen (110), glatte Muskelzellen (111) und auch Leukozyten wird durch erhöhte cAMP-Spiegel gehemmt. Für T-Zellen konnte

gezeigt werden, dass cAMP die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung, die Zytokinaussschüttung und das Fortschreiten in die G<sub>1</sub>-Phase verhindert (112). Weiterhin konnte über Inhibition der Phosphodiesterase, welche den Abbau von cAMP katalysiert, und über cAMP-Analoga die Inhibition der PAF (Plättchen-aktivierender Faktor)- oder IL-8-induzierten T-Zellchemotaxis gezeigt werden (84). Die Hypothese, dass der PF4-vermittelte inhibitorische Effekt auf eine Bildung von cAMP zurückzuführen ist, konnte durch mehrere Experimente widerlegt werden. Zwar ließ sich die I-Tac-induzierte Chemotaxis humaner

T-Zellen prinzipiell durch den Einsatz von cAMP-Analoga hemmen (Abb.14), allerdings hatte weder die Inhibition der Phosphodiesterase oder der PKA einen Einfluss auf den PF4-Effekt, noch konnte ein intrazellulärer Anstieg von cAMP nach PF4 Stimulation nachgewiesen werden. Bei einer Neusynthese von cAMP und Blockierung des Abbaus des Moleküls durch den Inhibitor der Phosphodiesterase hätte eine Verstärkung des inhibitorischen Effektes eintreten müssen, während die Inhibition der durch cAMP aktivierten PKA zur Aufhebung des PF4-Effektes zur Folge haben sollte. Beide Ergebnisse traten jedoch nicht ein. Schließlich konnte ich zeigen, dass es innerhalb der ersten 30 Minuten in PF4-stimulierten T-Zellen nicht zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration kam (Abb.15). Zusammenfassend lässt sich cAMP als Vermittler der PF4-induzierten Inhibition der Chemotaxis ausschließen.

Ein weiterer interessanter Kandidat bei der Regulation von Zellfunktionen ist das Sphingosin-1-phosphat, welches zu den wichtigsten Vertretern der Lysophospholipiden zählt. Neben der Bindung an Rezeptoren vermittelt Sphingosin-1-phosphat einen Teil seiner Effekte als intrazellulärer Mediator und ist an der Steuerung von zellulären Vorgängen wie Apoptose, Differenzierung, Migration und Proliferation beteiligt (85). Für T-Zellen konnte eine Inhibition der Proliferation und Zytokinfreisetzung (95) gezeigt werden. Interessanterweise induziert Sphingosin-1-phosphat in niedrigen Konzentrationen Chemotaxis und verstärkt die durch andere Chemokine-induzierte Chemotaxis (113), während bei Plasma oder Lymphkonzentrationen die Chemotaxis gegenüber anderen Chemokine deutlich gehemmt wird (86). Obwohl Sphingosin-1-phosphat eine zentrale Funktion bei der PF4-vermittelten Aktivierung von Monozyten besitzt, scheint dieses Molekül bei der PF4-induzierten Hemmung der I-Tac-induzierten Chemotaxis keine Rolle zu spielen. Die Inhibition der Sphingosinkinase, welche die Aktivierung von Sphingosin-1-phosphat bewirkt, hatte keinen Effekt auf die durch PF4 vermittelte Funktion (Abb.16).

Um mögliche Ansatzpunkte bei der Interferenz von PF4 mit der I-Tac-induzierten

Signalkaskade identifizieren zu können, wurden zunächst wichtige intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle auf ihre Beteiligung an der I-Tac-induzierten Chemotaxis überprüft.

Eine Beteiligung an der gerichteten Zellwanderung konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen für die Signalmoleküle MAPK-Kinase MEK, die zwei MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38), Src-Kinasen, Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), die Effektorkinase ROCK (RhoA-accociated kinase) und die kleine GTPase Ras in verschiedenen Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden (89,114-119). Aufgrund der hier durchgeführten Inhibitorstudien konnte jedoch, bis auf Ras und ROCK, die Beteiligung von den oben genannten Signalmolekülen in der I-Tacinduzierten Migration von T-Zellen ausgeschlossen werden (Abb.17). Die Verwendung des ROCK-Inhibitors in der I-Tac-induzierten Chemotaxis in T-Zellen führte zu einer partiellen Inhibition der Chemotaxis, was für eine untergeordnete Rolle von ROCK in der I-Tacinduzierten Chemotaxis spricht (Abb.17). Interessanterweise blockierte die Inhibition von Ras vollständig die I-Tac-induzierte Chemotaxis (Abb.18). Ras gilt als ein zentraler Regulator in vielen Signalwegen, welcher in der Lage ist, zelluläre Prozesse an- und abzuschalten. Es ist bekannt, dass Ras eine zentrale Rolle bei der Chemotaxis von Fibroblasten und des Einzellers Dictyostelium einnimmt (89,118). Für die Ausübung seiner Funktion muss Ras membranassoziiert vorliegen und GTP gebunden haben.

Über die Bestimmung von membranassoziertem Ras in der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wurde der Einfluss von PF4 auf die Ras-Aktivität untersucht. Bereits in den aktivierten T-Zellen lag eine gewisse Menge an Ras membranassoziert vor (Abb.19). Die Stimulation mit PF4 allein änderte nichts an der Verteilung, während I-Tac eine geringe Aufregulierung von membrangebundenem Ras bewirkte. Die Kostimulation mit beiden Chemokinen bewirkte überraschenderweise eine deutliche Zunahme von Ras an der Zellmembran. Dieses Ergebnis scheint auf den ersten Blick mit den Befunden der PF4 bzw. Manumycin vermittelten Hemmung der Chemotaxis im Widerspruch zu stehen. Eine Möglichkeit der Erklärung könnte in der Rolle von Ras als bifunktioneller Regulator sowohl von Chemotaxis als auch von Adhärenz bestehen. So konnte in meiner Arbeitsgruppe die Beteiligung von Ras an der Induktion der PF4-vermittelten Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen nachgewiesen werden (88). Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Ras für die Aktivierung des Integrins LFA-1 essentiell ist (120). Es ist daher denkbar, dass eine moderate (I-Tac-vermittelte) Aktivierung von Ras die Migration von T-Zellen begünstigt, während eine starke (I-Tac/PF4-vermittelte) Aktivierung eine Adhärenz der Zellen induziert. Der Beweis dieser Hypothese erfordert jedoch intensive weitere Untersuchungen, die eine exakte Erfassung der Ras-Aktivität einschließen.

Obwohl verschiedenen Chemotaxine unterschiedliche Signalwege aktivieren, erscheint die induzierte biologische Antwort, die gerichtete Migration, am Ende vergleichbar. Interessanterweise konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass der inhibitorische Effekt von PF4 nicht auf die I-Tac-induzierte Chemotaxis beschränkt ist. Auch die MIG-induzierte T-Zellchemotaxis wurde von PF4 in ähnlicher Weise wie das I-Tac-Signal gehemmt (Abb.4), während die IP-10-induzierte Chemotaxis nur zu einem geringen Ausmaß inhibiert wurde. Überraschenderweise lieferte die Verwendung des Chemokins SDF1- $\alpha$  in den Untersuchungen der T-Zellchemotaxis die Erkenntnis, dass der PF4-Effekt nicht auf Liganden des CXCR3 beschränkt ist (Abb.20). Darüber hinaus war PF4 auch in der Lage, die SDF1-αund NAP-2-induzierte Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten zu hemmen (Abb.21). SDF1- $\alpha$  spielt eine entscheidende Bedeutung bei der B-Zellentwicklung (121), der hämatopoetischen Stammzellmobilisierung (122) und der Migration von Leukozyten (123). Bis vor kurzem war mit dem CXCR4 für SDF1-α nur ein einziger Rezeptor bekannt, welcher auf vielen Leukozyten, unter anderem auch auf ruhenden T-Zellen, exprimiert wird (123). Vor kurzem wurden von Balabanian et al. auf T-Zellen der G-protein-gekoppelte Rezeptor CXCR7 (ehemals RDC-1) als zusätzlicher Rezeptor für SDF1- $\alpha$  beschrieben (124). Weiterhin konnten Burns et al. zeigen, dass I-Tac ebenfalls ein Ligand des CXCR7 darstellt (49). Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob PF4 als Antagonist für den CXCR7 wirken könnte und auf diese Weise die durch I-Tac und SDF1-a induzierte Chemotaxis blockiert. Dieser Hypothese müssen dabei zwei Argumente entgegengesetzt werden. Zum einem hemmt PF4 die MIG- und IP-10-vermittelte Chemotaxis in T-Zellen (Abb.4); nach Befunden von Burns et al. (49) binden diese beiden Chemokine jedoch nicht an den CXCR7. Zum anderen hat PF4 ebenfalls einen zumindest geringen inhibitorischen Effekt auf die NAP-2-vermittelte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (Abb.21A), welche ebenfalls CXCR7-unabhängig induziert wird.

Insgesamt zeigten diese Daten, dass der inhibitorische Effekt von PF4 weder auf eine durch CXCR3-Liganden induzierte Chemotaxis noch auf T-Zellen beschränkt ist. Damit scheint diese Inhibition von genereller Art zu sein, welche keine Selektivität für einen bestimmten Stimulus oder Zelltyp aufweist. Vorstellbar wäre, dass im Falle einer Infektion PF4 in der Lage ist, die Wanderung von Immunzellen in der Vaskulatur oder deren Grenzflächen zu stoppen, damit sie dort ihre Funktionen ausüben. So ein Mechanismus könnte beispielsweise

bei akuten Gefäßverletzungen oder anderen Vaskulitiden relevant sein, bei denen der Entzündungsherd im Gefäßsystem lokalisiert ist. Obwohl keine Daten zu Konzentrationen von PF4 an Orten einer akuten Thrombozytenaggregationen existieren, wären die im Serum vorliegenden Konzentrationen von 0,9 bis 1,9 µM PF4 bereits ausreichend (58), um die T-Zellchemotaxis zu modulieren. Neuesten Erkenntnissen nach ist das Auftreten von PF4 jedoch nicht auf die Vaskulatur beschränkt. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass auch Monozyten (125) und T-Zellen (126) in der Lage sind, PF4 zu bilden und freizusetzen. Diese Beobachtung legt nahe, dass es auch im infizierten Gewebe zu einer thrombozytenunabhängigen Freisetzung von PF4 kommen kann. Auf diese Weise könnte PF4 auch dort seine inhibitorische Wirkung auf die Chemotaxis entfalten und darüber die Immunzellen am Fokus der Entzündung festhalten.

Chemokine spielen eine wichtige Rolle in einer Reihe von Erkrankungen. So geht zum Beispiel die ernorme Infiltration von neutrophilen Granulozyten ins Lungengewebe bei Lungenkrankheiten wie dem ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) mit einer erhöhten Anwesenheit von IL-8 einher. Auch bei der viralen Meningitis wurden in der Zerebrospinalflüssigkeit erhöhte Mengen an IP-10 und MCP-1 nachgewiesen, die einen Einstrom von Lymphozyten und Monozyten verursachen. Weiterhin wurden auch in vielen chronischen Erkrankungen wie Atherosklerosen, Morbus Crohn und Sarkoidose (123) erhöhte Chemokinspiegel und die Einwanderung von Lymphhozyten und Makrophagen gezeigt. Die korrekte Regulierung von Immunzellen ist von entscheidender Bedeutung sowohl für die Abwehrleistung als auch die Integrität des Organismus. Mechanismen, über welche die Aktivität von Chemokinen reguliert werden, verlaufen unter anderem über die Inhibition der Chemokinsynthese, Neutralisation durch Autoantikörper oder die Bindung der freien Chemokine über sogenannte Scavangerrezeptoren (127). Die von mir hier erstmals beschriebene Kapazität von PF4, die Chemotaxis direkt zu hemmen, ist möglicherweise ein weiterer Mechanismus des Immunsystems, den Ablauf einer Immunantwort zu kontrollieren. Für PF4 konnten bereits sowohl aktivierende als auch inhibitorische Funktionen auf unterschiedlichen Zellpopulationen nachgewiesen werden. So induziert PF4 zum Beispiel in basophilen Granulozyten die Freisetzung von Histamin (63) und in Monozyten die Bildung von Sauerstoffmolekülen (67). Umgekehrt bewirkt PF4 die Hemmung der Megakaryogenese (72), der Angiogenese (73) und der Proliferation von T-Zellen (61). Während für einige aktivierende Funktionen die Interaktion von PF4 mit Proteoglykanen als notwendig nachgewiesen werden konnte (60), gelang es bisher nicht, die Vermittlung inhibitorischer Funktionen einem Rezeptor zuzuordnen. Da in dieser Arbeit die beiden bekannten Rezeptoren

nicht an der Vermittlung des inhibitorischen Signals beteiligt sind, muss die Existenz eines weiteren, bisher unbekannten Rezeptors für PF4 gefordert werden. Ziel weiterführender Arbeiten wird es sein, diesen Rezeptor zu identifizieren und dessen Signalmechanismen aufzuklären. Weiterhin muss geklärt werden, ob und inwieweit die Chemotaxis weiterer Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen oder dendritische Zellen, durch PF4 moduliert werden kann. Das tiefere Verständnis dieses Regulationsmechanismus könnte Ansatzpunkte für neue Strategien zur Therapie von akuten und chronischen Erkrankungen liefern.

#### 5 Zusammenfassung

T-Zellen sind als Teil des erworbenen Immunsystems sowohl als Effektoren als auch Regulatoren an der Immunantwort beteiligt. So aktivieren beispielsweise  $T_H$ 1-Zellen Makrophagen, während  $T_H$ 2-Zellen die Aktivität von B-Zellen regulieren. Als zytotoxische T-Zellen sind sie in der Lage, virusbefallende Zellen oder Tumorzellen abzutöten und als regulatorische T-Zellen können sie Immunantworten unterdrücken.

Um ihre biologische Funktion ausüben zu können, müssen die aktivierten T-Zellen in das entzündete Gewebe einwandern. Dies geschieht gerichtet entlang eines chemotaktischen Gradienten bis der Entzündungsherd erreicht ist. Die Kontrolle der chemotaktischen Antwort ist von entscheidender Bedeutung für die Abwehr und Homöostase und deren Fehlregulation, ist von schweren Erkrankungen begleitet.

In meiner Arbeit konnte ich erstmalig zeigen, dass das CXC-Chemokin Plättchen Faktor 4 (PF4; CXCL4) die Chemotaxis humaner aktivierter T-Zellen inhibiert. In Anwesenheit von PF4 reduziert sich die Anzahl der wandernden Zellen gegenüber den CXCR3-Liganden I-Tac (CXCL11) und MIG (CXCL9) um 30  $\pm$  15 %. Dieser Effekt war dosisabhängig und trat in einem physiologischen Konzentrationsbereich von 0,5 µM bis 8 µM PF4 auf.

Untersuchungen zum Mechanismus der PF4-vermittelten Inhibition zeigten, dass weder ein Regulationsprozess, rezeptorunabhängiger wie beispielsweise die Bildung von Heterooligomeren aus PF4 und I-Tac, noch die direkte oder indirekte Interaktion von PF4 mit dem die Chemotaxis vermittelnden Rezeptor CXCR3 daran beteiligt ist. Den Ergebnissen dieser Arbeit nach vermittelt PF4 die Inhibition der Chemotaxis von T-Zellen über einen eigenständigen Rezeptor. Die Untersuchung der durch diesen Rezeptor aktivierten intrazellulären Signalwege ergab, dass an der Hemmung der T-Zellwanderung weder die Bildung von cAMP oder Sphingosin-1-phosphat beteiligt ist noch Src-Kinasen oder MAP-Kinasen involviert sind. Weiterführende Experimente zeigten jedoch, dass der monomeren GTPase Ras eine Schlüsselstellung in der Regulation der chemotaktischen Antwort zukommt. Während I-Tac allein nur eine schwache, für die Migration aber essentielle Assoziation von Ras mit der Zellmembran vermittelt, bewirkt die zusätzlich Gabe von PF4 eine deutliche Steigerung der Membranbindung. Eine starke Aktivierung von Ras könnte für eine erhöhte Adhäsion, und damit einhergehend, einer verringerte Migration der Zellen verantwortlich sein.

Bisher wurden zwei biochemisch und funktionell unterschiedliche Rezeptoren für PF4 beschrieben. Während ein mit Chondroitinsulfaten asssoziiertes Proteoglykan die Bindung

von PF4 an neutrophilen Granulozyten vermittelt, hemmt das Chemokin das Wachstum von Endothelzellen über eine Interaktion mit dem Rezeptor CXCR3B, einer alternative Spleissvariante des CXCR3. Obwohl der überwiegende Teil der Bindung von PF4 an aktivierte T-Zellen tatsächlich über die Assoziation mit Proteoglykanen verläuft, konnte ich hier nachweisen, dass diese Rezeptoren an der PF4-vermittelten Inhibition der

T-Zellchemotaxis nicht beteiligt sind. Studien zur Rolle des CXCR3B ergaben zunächst, dass dieser Rezeptor in T-Zellen sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene deutlich exprimiert ist. In weiterführenden Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass dieser Rezeptor ausschließlich im Zellinneren lokalisiert ist und damit eine direkte Wechselwirkung mit PF4 als eher unwahrscheinlich gelten muss. Da sich darüber hinaus die I-Tac-induzierte Chemotaxis in T-Zellen der Maus trotz ihrer natürlichen Defizienz für CXCR3B durch PF4 hemmen ließ, kann eine Beteiligung dieses Rezeptors ebenfalls ausgeschlossen werden. Damit sprechen diese Daten eindeutig für die Existenz eines weiteren, bisher unbekannten Rezeptors, über den PF4, unabhängig von Proteoglykanen und CXCR3B, seine inhibitorische Funktion vermittelt.

In diese Vorstellung reihen sich meine abschließenden Befunde ein, nach denen die inhibitorische Wirkung von PF4 weder auf T-Zellen noch auf eine Hemmung der CXCR3vermittelten Chemotaxis beschränkt ist. Der Umstand, dass PF4 beispielsweise auch die SDF1-α-induzierte Migration von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten hemmt deutet auf ein breites physiologisches Spektrum dieser Wirkung hin.

Die biologische Relevanz des PF4-Effektes auf die Chemotaxis *in vivo* ist noch nicht geklärt. Es erscheint überraschend, dass der großen Anzahl an Induktoren einer Chemotaxis bisher nur sehr wenige Regulatoren dieser Funktion gegenüber stehen. PF4 wird als thrombozytäres Chemokin hauptsächlich in der Vaskulatur freigesetzt. Es ist daher vorstellbar, dass PF4 bei akuten oder chronisch entzündlichen Prozessen innerhalb des Gefäßsystems die Emigration von Immunzellen aus den Blutgefäßen verhindert und auf diese Weise eine Abwehr in der Vaskulatur ermöglicht. Die Kontrolle der Migration von Zellen des Immunsystems könnte ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Beeinflussung von entzündlichen Erkrankungen darstellen.

### 6 Literaturverzeichnis

- 1. Gemsa, D., J. R. Kalden, and K. Resch. Immunologie. Thieme.
- 2. Janeway, C. A. and P. Travers. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- 3. Steines, N., J. Brostoff, and K. James. *Immunologisches Grundwissen*. Gustav Fischer Verlag.
- 4. Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
- Meuer, S., M. Hauer, U. Moebius, E. Schiedhelm, K. Deusch, M. Schykowski, and K. H. Meyer zum Buschenfelde. 1986. Definition of discrete signals involved in human T-cell activation. *Mol.Immunol.* 23:1157-1163.
- Van Lier, R. A., J. H. Boot, E. R. De Groot, and L. A. Aarden. 1987. Induction of T cell proliferation with anti-CD3 switch-variant monoclonal antibodies: effects of heavy chain isotype in monocyte-dependent systems. *Eur.J.Immunol.* 17:1599-1604.
- O'Flynn, K., A. M. Krensky, P. C. Beverley, S. J. Burakoff, and D. C. Linch. 1985. Phytohaemagglutinin activation of T cells through the sheep red blood cell receptor. *Nature* 313:686-687.
- 8. Kannagi, R. 2002. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 12:599-608.
- Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Lohning, R. Brauer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch, and A. Hamann. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflammed tissues. *Nature* 385:81-83.
- 10. Westermann, J., E. M. Ehlers, M. S. Exton, M. Kaiser, and U. Bode. 2001. Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses. *Immunol.Rev.* 184:20-37.
- 11. Rollins, B. J. 1997. Chemokines. Blood 90:909-928.
- 12. Clore, G. M. and A. M. Gronenborn. 1995. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.* 9:57-62.
- 13. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv.Immunol.* 55:97-179.
- 14. Zlotnik, A., J. Morales, and J. A. Hedrick. 1999. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev.Immunol*. 19:1-47.
- 15. Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik, and T. J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640-644.

- Yan, Z., J. Zhang, J. C. Holt, G. J. Stewart, S. Niewiarowski, and M. Poncz. 1994. Structural requirements of platelet chemokines for neutrophil activation. *Blood* 84:2329-2339.
- 17. Baggiolini, M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J.Intern.Med.* 250:91-104.
- Kitaura, M., T. Nakajima, T. Imai, S. Harada, C. Combadiere, H. L. Tiffany, P. M. Murphy, and O. Yoshie. 1996. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophilselective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J.Biol.Chem.* 271:7725-7730.
- Menzies-Gow, A., S. Ying, I. Sabroe, V. L. Stubbs, D. Soler, T. J. Williams, and A. B. Kay. 2002. Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J.Immunol.* 169:2712-2718.
- 20. de Paulis, A., F. Annunziato, L. Di Gioia, S. Romagnani, M. Carfora, C. Beltrame, G. Marone, and P. Romagnani. 2001. Expression of the chemokine receptor CCR3 on human mast cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 124:146-150.
- Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J.Exp.Med.* 184:963-969.
- 22. Cole, K. E., C. A. Strick, T. J. Paradis, K. T. Ogborne, M. Loetscher, R. P. Gladue, W. Lin, J. G. Boyd, B. Moser, D. E. Wood, B. G. Sahagan, and K. Neote. 1998. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J.Exp.Med.* 187:2009-2021.
- Tensen, C. P., J. Flier, Van Der Raaij-Helmer EM, S. Sampat-Sardjoepersad, R. C. Van Der Schors, R. Leurs, R. J. Scheper, D. M. Boorsma, and R. Willemze. 1999. Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3). *J.Invest Dermatol.* 112:716-722.
- 24. Rabin, R. L., M. K. Park, F. Liao, R. Swofford, D. Stephany, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J.Immunol.* 162:3840-3850.
- 25. Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Lehrbuch der Molekulare Zellbiologie*.
- 26. Sauty, A., R. A. Colvin, L. Wagner, S. Rochat, F. Spertini, and A. D. Luster. 2001. CXCR3 internalization following T cell-endothelial cell contact: preferential role of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11). *J.Immunol.* 167:7084-7093.

- Petersen, F., H. D. Flad, and E. Brandt. 1994. Neutrophil-activating peptides NAP-2 and IL-8 bind to the same sites on neutrophils but interact in different ways. Discrepancies in binding affinities, receptor densities, and biologic effects. *J.Immunol*. 152:2467-2478.
- 28. Moser, B., C. Schumacher, T. von, V, I. Clark-Lewis, and M. Baggiolini. 1991. Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J.Biol.Chem.* 266:10666-10671.
- 29. Ogilvie, P., G. Bardi, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and M. Uguccioni. 2001. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 97:1920-1924.
- Syrbe, U., J. Siveke, and A. Hamann. 1999. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin.Immunopathol.* 21:263-285.
- Annunziato, F., G. Galli, L. Cosmi, P. Romagnani, R. Manetti, E. Maggi, and S. Romagnani. 1998. Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur.Cytokine Netw.* 9:12-16.
- 32. Bonecchi, R., G. Bianchi, P. P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J.Exp.Med.* 187:129-134.
- 33. Loetscher, P., M. Uguccioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J. M. Dayer. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.
- 34. Murdoch, C. and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95:3032-3043.
- 35. Rabin, R. L., M. K. Park, F. Liao, R. Swofford, D. Stephany, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J.Immunol.* 162:3840-3850.
- 36. Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J.Exp.Med.* 187:875-883.
- Romagnani, P., F. Annunziato, L. Lasagni, E. Lazzeri, C. Beltrame, M. Francalanci, M. Uguccioni, G. Galli, L. Cosmi, L. Maurenzig, M. Baggiolini, E. Maggi, S. Romagnani, and M. Serio. 2001. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J.Clin.Invest* 107:53-63.
- 38. Wang, X., T. L. Yue, E. H. Ohlstein, C. P. Sung, and G. Z. Feuerstein. 1996. Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *J.Biol.Chem.* 271:24286-24293.
- 39. Inngjerdingen, M., B. Damaj, and A. A. Maghazachi. 2001. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97:367-375.

- Jinquan, T., C. Jing, H. H. Jacobi, C. M. Reimert, A. Millner, S. Quan, J. B. Hansen, S. Dissing, H. J. Malling, P. S. Skov, and L. K. Poulsen. 2000. CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J.Immunol.* 165:1548-1556.
- 41. Widney, D. P., Y. R. Xia, A. J. Lusis, and J. B. Smith. 2000. The murine chemokine CXCL11 (IFN-inducible T cell alpha chemoattractant) is an IFN-gamma- and lipopolysaccharide-inducible glucocorticoid-attenuated response gene expressed in lung and other tissues during endotoxemia. *J.Immunol.* 164:6322-6331.
- 42. Mazanet, M. M., K. Neote, and C. C. Hughes. 2000. Expression of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant by human endothelial cells is cyclosporin A-resistant and promotes T cell adhesion: implications for cyclosporin A-resistant immune inflammation. *J.Immunol.* 164:5383-5388.
- Sauty, A., M. Dziejman, R. A. Taha, A. S. Iarossi, K. Neote, E. A. Garcia-Zepeda, Q. Hamid, and A. D. Luster. 1999. The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J.Immunol.* 162:3549-3558.
- 44. Gasperini, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber, and M. A. Cassatella. 1999. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J.Immunol.* 162:4928-4937.
- 45. Farber, J. M. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J.Leukoc.Biol.* 61:246-257.
- 46. Hensbergen, P. J., P. G. Wijnands, M. W. Schreurs, R. J. Scheper, R. Willemze, and C. P. Tensen. 2005. The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis. *J.Immunother.*(1997.) 28:343-351.
- 47. Loetscher, P. and I. Clark-Lewis. 2001. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J.Leukoc.Biol.* 69:881-884.
- 48. Petkovic, V., C. Moghini, S. Paoletti, M. Uguccioni, and B. Gerber. 2004. I-TAC/CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. *J.Leukoc.Biol.* 76:701-708.
- Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard, and T. J. Schall. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J.Exp.Med.* 203:2201-2213.
- 50. Uguccioni, M., P. Gionchetti, D. F. Robbiani, F. Rizzello, S. Peruzzo, M. Campieri, and M. Baggiolini. 1999. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am.J.Pathol.* 155:331-336.

- Sorensen, T. L., M. Tani, J. Jensen, V. Pierce, C. Lucchinetti, V. A. Folcik, S. Qin, J. Rottman, F. Sellebjerg, R. M. Strieter, J. L. Frederiksen, and R. M. Ransohoff. 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest* 103:807-815.
- 52. Balashov, K. E., J. B. Rottman, H. L. Weiner, and W. W. Hancock. 1999. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:6873-6878.
- 53. Mach, F., A. Sauty, A. S. Iarossi, G. K. Sukhova, K. Neote, P. Libby, and A. D. Luster. 1999. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J.Clin.Invest* 104:1041-1050.
- 54. Lasagni, L., M. Francalanci, F. Annunziato, E. Lazzeri, S. Giannini, L. Cosmi, C. Sagrinati, B. Mazzinghi, C. Orlando, E. Maggi, F. Marra, S. Romagnani, M. Serio, and P. Romagnani. 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J.Exp.Med.* 197:1537-1549.
- 55. Deuel, T. F., P. S. Keim, M. Farmer, and R. L. Heinrikson. 1977. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74:2256-2258.
- 56. Zhang, X., L. Chen, D. P. Bancroft, C. K. Lai, and T. E. Maione. 1994. Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry* 33:8361-8366.
- 57. Mayo, K. H. and M. J. Chen. 1989. Human platelet factor 4 monomer-dimer-tetramer equilibria investigated by 1H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 28:9469-9478.
- 58. Files, J. C., T. W. Malpass, E. K. Yee, J. L. Ritchie, and L. A. Harker. 1981. Studies of human platelet α-release in vivo. *Blood* 58:607-618.
- 59. Niewiarowski, S., B. Rucinski, and A. Z. Budzynski. 1979. Low affinity platelet factor 4 and high affinity platelet factor 4. Two antiheparin factors secreted by human platelets. *Thromb.Haemost.* 42:1679.
- 60. Petersen, F., L. Bock, H. D. Flad, and E. Brandt. 1998. A chondroitin sulfate proteoglycan on human neutrophils specifically binds platelet factor 4 and is involved in cell activation. *J.Immunol.* 161:4347-4355.
- 61. Fleischer, J., E. Grage-Griebenow, B. Kasper, H. Heine, M. Ernst, E. Brandt, H. D. Flad, and F. Petersen. 2002. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J.Immunol.* 169:770-777.
- 62. Marti, F., E. Bertran, M. Llucia, E. Villen, M. Peiro, J. Garcia, and F. Rueda. 2002. Platelet factor 4 induces human natural killer cells to synthesize and release interleukin-8. *J.Leukoc.Biol.* 72:590-597.

- Han, Z. C., A. M. Maurer, S. Bellucci, H. Y. Wan, Y. Kroviarski, O. Bertrand, and J. P. Caen. 1992. Inhibitory effect of platelet factor 4 (PF4) on the growth of human erythroleukemia cells: proposed mechanism of action of PF4. *J.Lab Clin.Med.* 120:645-660.
- Caen, J. P., X. Xi, S. Aidoudi, S. Fournier, N. Schlegel, S. Bellucci, and Z. C. Han. 1995. [Platelet factor 4, reversible inhibitor of megakaryocytogenesis, protector of megakaryocytes during chemotherapy]. *Bull.Acad.Natl.Med.* 179:1657-1670.
- 65. Schenk, B. I., F. Petersen, H. D. Flad, and E. Brandt. 2002. Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J.Immunol.* 169:2602-2610.
- 66. Petersen, F., A. Ludwig, H. D. Flad, and E. Brandt. 1996. TNF-alpha renders human neutrophils responsive to platelet factor 4. Comparison of PF-4 and IL-8 reveals different activity profiles of the two chemokines. *J.Immunol.* 156:1954-1962.
- 67. Pervushina, O., B. Scheuerer, N. Reiling, L. Behnke, J. M. Schroder, B. Kasper, E. Brandt, S. Bulfone-Paus, and F. Petersen. 2004. Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J.Immunol.* 173:2060-2067.
- 68. Scheuerer, B., M. Ernst, I. Durrbaum-Landmann, J. Fleischer, E. Grage-Griebenow, E. Brandt, H. D. Flad, and F. Petersen. 2000. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 95:1158-1166.
- 69. Detmers, P. A., D. E. Powell, A. Walz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and Z. A. Cohn. 1991. Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. *J.Immunol.* 147:4211-4217.
- 70. Clark-Lewis, I., B. Dewald, T. Geiser, B. Moser, and M. Baggiolini. 1993. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:3574-3577.
- 71. Walz, A., B. Dewald, V. von Tscharner, and M. Baggiolini. 1989. Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *J.Exp.Med.* 170:1745-1750.
- 72. Han, Z. C., S. Bellucci, A. Walz, M. Baggiolini, and J. P. Caen. 1990. Negative regulation of human megakaryocytopoiesis by human platelet factor 4 (PF4) and connective tissue-activating peptide (CTAP-III). *Int.J.Cell Cloning* 8:253-259.
- Jouan, V., X. Canron, M. Alemany, J. P. Caen, G. Quentin, J. Plouet, and A. Bikfalvi. 1999. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood* 94:984-993.

- 74. Liu, C. Y., M. Battaglia, S. H. Lee, Q. H. Sun, R. H. Aster, and G. P. Visentin. 2005. Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+. *J.Immunol.* 174:2680-2686.
- 75. Romagnani, P., L. Maggi, B. Mazzinghi, L. Cosmi, L. Lasagni, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Angeli, M. Rotondi, L. Fili, P. Parronchi, M. Serio, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2005. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J.Allergy Clin.Immunol.* 116:1372-1379.
- 76. Brandt, E., J. Van Damme, and H. D. Flad. 1991. Neutrophils can generate their activator neutrophil-activating peptide 2 by proteolytic cleavage of platelet-derived connective tissue-activating peptide III. *Cytokine* 3:311-321.
- 77. Ludwig, A., F. Petersen, S. Zahn, O. Gotze, J. M. Schroder, H. D. Flad, and E. Brandt. 1997. The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood* 90:4588-4597.
- 78. Grage-Griebenow, E., D. Lorenzen, R. Fetting, H. D. Flad, and M. Ernst. 1993. Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur.J.Immunol.* 23:3126-3135.
- 79. Kasper, B., H. H. Thole, S. D. Patterson, and K. Welte. 1997. Cytosolic proteins from neutrophilic granulocytes: a comparison between patients with severe chronic neutropenia and healthy donors. *Electrophoresis* 18:142-149.
- 80. BOYDEN, S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J.Exp.Med.* 115:453-466.
- 81. Ludwig, A., F. Schiemann, R. Mentlein, B. Lindner, and E. Brandt. 2002. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J.Leukoc.Biol.* 72:183-191.
- 82. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* 260:3440-3450.
- 83. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410.
- 84. Hidi, R., S. Timmermans, E. Liu, C. Schudt, G. Dent, S. T. Holgate, and R. Djukanovic. 2000. Phosphodiesterase and cyclic adenosine monophosphate-dependent inhibition of T-lymphocyte chemotaxis. *Eur.Respir.J.* 15:342-349.
- 85. Leclercq, T. M. and S. M. Pitson. 2006. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB.Life* 58:467-472.
- 86. Graeler, M., G. Shankar, and E. J. Goetzl. 2002. Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. *J.Immunol.* 169:4084-4087.

- 87. König, R. and W. Zhou. Handbook of Cell Signaling, Volume 3.
- 88. Kasper, B., E. Brandt, M. Ernst, and F. Petersen. 2005. Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 (PF4; CXCL4) requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases. *Blood*.
- 89. Charest, P. G. and R. A. Firtel. 2007. Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem.J.* 401:377-390.
- 90. Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer, and C. R. Mackay. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:1925-1930.
- 91. Nagase, H., M. Miyamasu, M. Yamaguchi, M. Imanishi, N. H. Tsuno, K. Matsushima, K. Yamamoto, Y. Morita, and K. Hirai. 2002. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 71:711-717.
- 92. Le, Y., Y. Zhou, P. Iribarren, and J. Wang. 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol.Immunol.* 1:95-104.
- Greenberger, M. J., R. M. Strieter, S. L. Kunkel, J. M. Danforth, R. E. Goodman, and T. J. Standiford. 1995. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia. *J.Immunol.* 155:722-729.
- 94. Petersen, F., L. Bock, H. D. Flad, and E. Brandt. 1999. Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8. *Blood* 94:4020-4028.
- 95. Dorsam, G., M. H. Graeler, C. Seroogy, Y. Kong, J. K. Voice, and E. J. Goetzl. 2003. Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. *J.Immunol.* 171:3500-3507.
- 96. Hecht, I., L. Cahalon, R. Hershkoviz, A. Lahat, S. Franitza, and O. Lider. 2003. Heterologous desensitization of T cell functions by CCR5 and CXCR4 ligands: inhibition of cellular signaling, adhesion and chemotaxis. *Int.Immunol.* 15:29-38.
- 97. Proudfoot, A. E., T. M. Handel, Z. Johnson, E. K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T. N. Wells, and M. H. Kosco-Vilbois. 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:1885-1890.
- Crown, S. E., Y. Yu, M. D. Sweeney, J. A. Leary, and T. M. Handel. 2006. Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding. *J.Biol.Chem.* 281:25438-25446.
- 99. Paoletti, S., V. Petkovic, S. Sebastiani, M. G. Danelon, M. Uguccioni, and B. O. Gerber. 2005. A rich chemokine environment strongly enhances leukocyte migration and activities. *Blood* 105:3405-3412.

- Perollet, C., Z. C. Han, C. Savona, J. P. Caen, and A. Bikfalvi. 1998. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 91:3289-3299.
- Dudek, A. Z., I. Nesmelova, K. Mayo, C. M. Verfaillie, S. Pitchford, and A. Slungaard. 2003. Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood* 101:4687-4694.
- 102. von Hundelshausen, P., R. R. Koenen, M. Sack, S. F. Mause, W. Adriaens, A. E. Proudfoot, T. M. Hackeng, and C. Weber. 2005. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 105:924-930.
- 103. Luster, A. D., S. M. Greenberg, and P. Leder. 1995. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J.Exp.Med.* 182:219-231.
- 104. Schiemann, F., T. A. Grimm, J. Hoch, R. Gross, B. Lindner, F. Petersen, S. Bulfone-Paus, and E. Brandt. 2006. Mast cells and neutrophils proteolytically activate chemokine precursor CTAP-III and are subject to counterregulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G. *Blood* 107:2234-2242.
- 105. Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. Nat. Immunol. 2:129-134.
- 106. Premack, B. A. and T. J. Schall. 1996. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat.Med.* 2:1174-1178.
- 107. Kinashi, T. 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat.Rev.Immunol.* 5:546-559.
- 108. Pettit, E. J. and F. S. Fay. 1998. Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev.* 78:949-967.
- 109. Hecquet, C., G. Lefevre, M. Valtink, K. Engelmann, and F. Mascarelli. 2002. cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner. *Oncogene* 21:6101-6112.
- 110. Ito, C., H. Yamamoto, Y. Furukawa, S. Takeda, T. Akimoto, O. Iimura, Y. Ando, Y. Asano, and E. Kusano. 2004. Role of cyclins in cAMP inhibition of glomerular mesangial cell proliferation. *Clin.Sci.(Lond)* 107:81-87.
- 111. Fan, Y. Y., K. S. Ramos, and R. S. Chapkin. 1996. Cell cycle related inhibition of mouse vascular smooth muscle cell proliferation by prostaglandin E1: relationship between prostaglandin E1 and intracellular cAMP levels. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 54:101-107.
- 112. Grader-Beck, T., A. A. van Puijenbroek, L. M. Nadler, and V. A. Boussiotis. 2003. cAMP inhibits both Ras and Rap1 activation in primary human T lymphocytes, but only Ras inhibition correlates with blockade of cell cycle progression. *Blood* 101:998-1006.

- Graeler, M. and E. J. Goetzl. 2002. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *FASEB J*. 16:1874-1878.
- 114. Amagasaki, K., H. Kaneto, C. H. Heldin, and J. Lennartsson. 2006. c-Jun N-terminal kinase is necessary for platelet-derived growth factor-mediated chemotaxis in primary fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 281:22173-22179.
- 115. Shahabuddin, S., R. Ji, P. Wang, E. Brailoiu, N. Dun, Y. Yang, M. O. Aksoy, and S. G. Kelsen. 2006. CXCR3 chemokine receptor-induced chemotaxis in human airway epithelial cells: role of p38 MAPK and PI3K signaling pathways. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 291:C34-C39.
- 116. Bonacchi, A., P. Romagnani, R. G. Romanelli, E. Efsen, F. Annunziato, L. Lasagni, M. Francalanci, M. Serio, G. Laffi, M. Pinzani, P. Gentilini, and F. Marra. 2001. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J.Biol.Chem.* 276:9945-9954.
- 117. Zhelev, D. V., A. M. Alteraifi, and D. Chodniewicz. 2004. Controlled pseudopod extension of human neutrophils stimulated with different chemoattractants. *Biophys.J.* 87:688-695.
- 118. Sasaki, A. T. and R. A. Firtel. 2006. Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR. *Eur.J.Cell Biol.* 85:873-895.
- 119. Wu, D. 2005. Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. Cell Res. 15:52-56.
- 120. O'Rourke, A. M., H. Shao, and J. Kaye. 1998. A role for p21ras/MAP kinase in TCRmediated activation of LFA-1. *J.Immunol.* 161:5800-5803.
- 121. Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson, and T. A. Springer. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:9448-9453.
- 122. Aiuti, A., I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J.Exp.Med.* 185:111-120.
- 123. Luster, A. D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N.Engl.J.Med.* 338:436-445.
- 124. Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K. Y. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen, and F. Bachelerie. 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 280:35760-35766.
- 125. Schaffner, A., P. Rhyn, G. Schoedon, and D. J. Schaer. 2005. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J.Leukoc.Biol.* 78:202-209.

- 126. Lasagni, L., R. Grepin, B. Mazzinghi, E. Lazzeri, C. Meini, C. Sagrinati, F. Liotta, F. Frosali, E. Ronconi, Alain-Court, L. Ballerini, G. S. Netti, E. Maggi, F. Annunziato, M. Serio, S. Romagnani, A. Bikfalvi, and P. Romagnani. 2007. PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood* 109:4127-4134.
- 127. Furie, M. B. and G. J. Randolph. 1995. Chemokines and tissue injury. Am.J.Pathol. 146:1287-1301.

# 7 Anhang (Puffer, Medien, Reagenzien)

Alle Reagenzien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma bezogen.

#### Trifluoressigsäure (TFA)

0,1 % (v/v) TFA in aqua bidest

### **Zellisolierung und -kultur**

## Zitratpuffer pH 3

0,1 M Zitronensäure mit 0,1 M Natrium-Zitrat auf pH 3 eingestellt

### PBS nach Dulbecco (PBS-D)

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 140 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> Substanzen einzeln in aqua bidest. gelöst und auf pH 7,2 eingestellt

### Elutriationsmedium

9,858 g Hanks' balanced salt solution (HBSS) auf einen Liter aqua bidest. pH 7,3
0,1 % Rinderserum
0,01 M HEPES (N-(2-Hydroxyethyl-)piperizin-N'2-ethansulfonsäure)
4,16 mM NaHCO<sub>3</sub>

### Kulturmedium

RPMI 10 % FCS 1 % PEST 1 % L-Glutamin 7. Anhang

#### Trypanblaulösung

0,1 % (w/v) Trypan-Blau, in aqua bidest 0,9 % (w/v) NaCl

#### Erythrozytenlysepuffer

0,83 % w/v Ammoniumchlorid 0,168% w/v Natriumcarbonat 1 mM EDTA Substanzen in aqua bidest gelöst und auf pH 7,3 eingestellt und steril filtrier

#### **Chemotaxis**

#### **Cl-Medium**

RPMI (ohne Phenolrot und NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM HEPES) 0,1 % w/v BSA

#### Triton-X 100 (1%)

1 % v/v Triton-X 100 in PBS-D

#### Substratlösung

0,01 M p-Nitrophenyl-b-Glucuronid 0,1 M Na Acetat in aqua bidest. Gelöst und auf pH 4 eingestellt

#### Glyzinpuffer

0,4 M Glyzin in aqua bidest. gelöst und auf pH 10,3 eingestellt

#### Ethanolische NaOH

1 M NaOH 50% v/v EtOH in aqua bidest

## Chemotaxis-Phosphatpuffer

1,75% w/v Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O in aqua bidest. gelöst und auf pH 7 eingestellt

# PBS-D mit Calcium, Magnesium und 0,1 % BSA

0,1% w/v BSA 0,9 mM CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS-D

## **Durchflusszytometrie**

## **PBS-Azid**

PBS, pH 7,2 15 mM Natriumazid gelöst in PBS

# Paraformaldehyd (3%)

30 g Paraformaldehyd in 1 l PBS-Azid gelöst

# Triton-X-100 (0,1 %)

0,1 % v/v Triton-X 100 0,1 % w/v BSA in PBS-D

### Zellkulturmedien und Zusätze:

Aqua ad inectabila Braun (pyrogenfrei): Braun, Heidelberg BSA (bovine serum albumin) als Zusatz zum Elutriationsmedium: Sigma, Taufkirchen BSA (lyophilisierte Fraktion 5, low endotoxin): PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich FCS (Fötales Kälberserum): PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich HBSS (Hanks' balanced salt solution): Cell Concepts GmbH, Umkirch HEPES (N-(2-Hydroxyethyl-)piperizin-N'2-ethansulfonsäure): Cell Concepts GmbH, Umkirch L-Glutamin (200 mM): PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich Pancoll: 1,077g/ml, PAN Biotech GmbH, Aidenbach Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin 10000 mg/ml und Streptomycin):Biochrom, Berlin Plasmasteril: Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg **RPMI:** Biochrom, Berlin RPMI (ohne Phenolrot, ohne NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES): Biochrom, Berlin Trypanblau: Chroma, Stuttgart-Untertürkheim

### <u>Geräte</u>

Brutschrank: HeraCell, *Heraeus*, Hanau
Elektrophoresekammer: Midi-1-Elektrophoresekammer, *Roth*, Karlsruhe
Mikroskop: Standard, *Zeiss*, Jena
Mikroskop: Inversmikroskop, *Zeiss*, Jena
Thermomixer: Modell 5437, *Eppendorf*, Hamburg
Tischzentrifuge: Mikroliter, *Hettich*, Tuttlingen
Zentrifuge: Ole Dich, *Instrumentmarkers APS*, Hvidovre, Dänemark
Zentrifuge: Mikro 200, *Hettich*, Tuttlingen
Zentrifuge: Mikro 200, *Hettich*, Tuttlingen
Zentrifuge: Modell 3-18K, *Sigma*, Taufkirchen
Photometer: Tecan Sunrise, *Deutschland GmbH*, Crailsheim
Fluoreszenzmikroskop (Leitz Aristoplan): *Leica*, *Diaphot*, *Nikon*, Tokyo, Japan

#### **Computerprogramme**

CorelGraphics Suite 11 für Windows: Corel, Dublin,Irland LightCycler Software Version 3.5.3.: Roche, Mannheim Microsoft Exel 2000 für Windows: Microsoft cooperation, Unterschleißheim Microsoft Word 2000 für Windows: Microsoft cooperation, Unterschleißheim Origin 6.0 für Windows: Microbial Software, Northampton, MA,USA WinMDI 2.8: J.Trotter, Scripps Institute, Kalifornien, USA

#### **Labormaterialien**

Einwegspritzen (1 ml): *BD*, Heidelberg Sterilfilter (0,2μm, pyrogenfrei): *Sarstedt*,, Nümbrecht Zellkulturflaschen (25+ 75cm<sup>2</sup>): *Sarstedt*,, Nümbrecht Zentrifugationsröhrchen (15+50 ml): *Sarstedt*,, Nümbrecht

# Veröffentlichungen

Geske Woller, Ernst Brandt, Jessica Mittelstädt, Christian Rybakowski, Frank Petersen. *Platelet factor 4/CXCL4-stimulated human monocytes induce apoptosis in endothelial cells by the release of oxygen radicals*. (2007) (zur Publikation eingereicht, Journal of Leukocyte Biology)

Kongressbeiträge:

36th Meeting of the German Society of Immunology (DGFI). Kiel, Deutschland PF-4/CXCL4 mediates cytotoxicity of monocytes against endothelial cells (September 2005)

# Lebenslauf

# Persönliche Daten:

Name:	Geske Woller
Anschrift:	Geverdesstraße. 8, 23554 Lübeck
Geburtsdatum:	22. Mai 1978
Geburtsort:	Kiel
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

# **Bisheriger Werdegang:**

Seit 07/2004	Promotion am Forschungszentrum Borstel,	
	Abteilung Immunologie und Zellbiologie,	
	Laborgruppe Biochemische Immunologie	
07/2003-06/2004	Diplomarbeit am Forschungszentrum Borstel	
	unter der Leitung von PD Dr. F. Petersen mit dem Thema:	
	Plättchenfaktor-4-vermittelte Zytotoxizität humaner Monozyten	
06/2003	Diplomprüfung in den Fächern	
	Zellbiologie, Zoologie und Biochemie	
10/1999-06/2003	Studium der Biologie an der	
	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	
08/1998- 07/1999	Sprachaufenthalt in Frankreich als Aupair-Mädchen	
08/1989 - 06/1998	Besuch des Johann-Heinrich-Voss-Gymnasium Eutin	
08/1985 - 07/1989	Besuch der Grundschule Malente	

### Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Frank Petersen für die Überlassung des Themas, sein stetiges Interesse am Verlauf der Arbeit und seine kontinuierliche Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus als Leiterin des Institutsbereiches Immunologie und Zellbiologie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Forschungszentrum Borstel.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Ernst Brandt für die vielen hilfsreichen Ratschläge und Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Martin Ernst möchte ich mich recht herzlich für seine Unterstützung vor allem im Bereich der Statistik bedanken.

Für die Bereitstellung von murinen Milzen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Norbert Reiling und der Arbeitsgruppe Molekulare Infektiologie bedanken.

Herzlicher Dank gilt den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Laborgruppen Biochemische Immunologie und Biologische Chemie Frau Dr. Brigitte Kasper, Frau Dr. Jessica Mittelstädt, Herrn Roland Gross, Herrn Dr. Florian Schiemann, Frau Oranos Ghulam und Herrn Jan Schulmistrat für praktische Hinweise, Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei Frau Renate Bergmann und Frau Erika Kaltenhäuser möchte ich mich für die technische Mitarbeit bedanken.

Für die großartige technische und soziale Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Cindy Hass und Frau Diana Heinrich sowie der gesamten Frühstücksrunde bedanken, welche gerade in der letzten Phase der Arbeit eine gelungene Abwechslung darstellte.

Ein besonderer Dank gilt den "Babelsbergern" für die sorgfältige Durchsicht meines Manuskriptes.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meinen Eltern und Achim, die mich in allen Phasen meiner Arbeit mit viel Verständnis unterstützt haben.
## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich, Geske Woller, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, September 2007

Geske Woller

- 1. Berichterstatter:
- 2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: