

# **Molekulare Wirkmechanismen rekombinant hergestellter Chemokinrezeptor-Antagonisten auf entzündungsrelevante Immunzellen**

Vom Fachbereich Biologie der  
Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des Grades Doctor rerum naturalium  
-Dr. rer. nat.-  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Simone Rubant  
geboren am 22.11.1975  
in Offenbach am Main

Referenten: Prof. Dr. Heinfried H. Radeke  
Prof. Dr. Thomas Holstein  
Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2005

*Meinen Eltern*

## **Vorbemerkungen**

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2001 bis Dezember 2004 in der Arbeitsgruppe Immunpharmakologie des *pharmazentrums frankfurt* unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. H. Radeke angefertigt. Die externe Betreuung wurde von Herrn Prof. Dr. Th. Holstein, TU Darmstadt, durchgeführt.

### **Förderung des Projektes**

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und im Rahmen der Dr. Dr. h.c. Hans-Schleussner-Stiftung Immunpharmakologie gefördert.

### **Sprachkonventionen**

Soweit es sinnvoll erschien, wurden einige im wissenschaftlichen Sprachgebrauch vorkommende englische Fachausdrücke zusätzlich ins Deutsche übersetzt. Englische Fachbegriffe und Abkürzungen wurden durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet.

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| $\alpha$ -F-     | $\alpha$ -Faktor-Signalspeptid                        |
| °C               | Grad Celsius  |
| $\mu$ l          | Mikroliter  |
| $\mu$ M          | Mikromolar  |
| $\mu$ m          | Mikrometer  |
| A                | Adenin  |
| Ak               | Antikörper  |
| AOP-RANTES       | Aminooxypentan-RANTES                                 |
| AOX              | Alkoholoxidase  |
| APS              | Ammoniumpersulfat                                     |
| BMMC             | Bone marrow derived mast cell                         |
| bp               | Basenpaar   |
| BSA              | Bovines Serumalbumin                                  |
| C                | Cytosin   |
| Ca <sup>2+</sup> | Kalzium   |
| CD               | clusters of differentiation zB. CD4                   |
| cDNA             | complementary DNA                                     |
| CFDA SE          | carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester     |
| ConA             | Concanavalin A  |
| CR               | Chemokinrezeptor                                      |
| CTL              | Zytotoxische T-Lymphozyten                            |
| CXCR             | CXC-Chemokinrezeptor                                  |
| DC               | Dendritische Zelle                                    |
| DMEM             | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                    |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                                      |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                                |
| dNTP             | Desoxyribonukleosidtriphosphat                        |
| DTH              | Delayed-type hypersensitivity                         |
| DTT              | Dithiothreitol  |
| EDTA             | Ethyldiamintetraacetat                                |
| ELISA            | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                     |
| EM               | extrazelluläre Matrix                                 |
| FACS             | Fluorescence Activated Cell Sorter                    |
| FKS              | Fötales Kälberserum                                   |
| FSC              | Forward angle light scatter                           |
| G                | Guanin  |
| g                | Erdbeschleunigungskonstante (9,8 m/sec <sup>2</sup> ) |
| g                | Gramm   |
| Gags             | Glukosaminoglykane                                    |
| GBM              | Glomeruläre Basalmembran                              |
| GM-CSF           | Granulocyte-Macrophage-Colony stimulating Factor      |
| GN               | Glomerulonephritis                                    |
| GPCR             | G-Protein coupled receptor                            |
| GRK              | G-Protein coupled receptor kinase                     |
| GRO- $\alpha$    | Growth-related-Oncogene- $\alpha$                     |
| h                | hour / Stunde   |
| H <sub>2</sub> O | Wasser  |
| HBSS             | Hank's balanced salt solution                         |
| HCl              | Salzsäure   |
| HHV-8            | Humanes Herpesvirus-8                                 |
| HIV              | Humanes Immundefizienzvirus                           |
| HRP              | Horse reddish peroxidase                              |

|                  |   |
|------------------|---|
| IC <sub>50</sub> | inhibitory concentration 50%; Maß der Rezeptor-Bindungsaffinität        |
| ICAM-1           | Intercellular adhesion molecule-1                                       |
| IFN- $\gamma$    | Interferon- $\gamma$  |
| IgG              | Immunglobulin gamma   |
| IL               | Interleukin, z.B. Interleukin-2: IL-2                                   |
| IP-10            | IFN- $\gamma$ induced Protein of 10 kDa (CXCL10)                        |
| ITAC             | IFN- $\gamma$ inducible T-cell $\alpha$ chemoattractant (CXCL11)        |
| Jak              | Janus associated kinase   |
| kb               | Kilobasen   |
| kDa              | 10 <sup>3</sup> Dalton, Molekulargewicht von Proteinen                  |
| KSHV             | Kaposi's Sarkom-assoziiertes Herpesvirus                                |
| L                | Liter   |
| LDH              | Lactat-Dehydrogenase  |
| LPS              | Lipopolysaccharid   |
| M                | molar (Mol/l)   |
| MCP-1            | Monocyte chemoattractant protein-1                                      |
| Met-RANTES       | N-terminal mit Methionin modifiziertes RANTES                           |
| MHC              | 'major histocompatibility complex',<br>Haupthistokompatibilitätskomplex |
| min              | Minute  |
| MIP-1 $\beta$    | macrophage inflammatory protein 1 $\beta$                               |
| MIP-1 $\alpha$   | macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ '                            |
| ml               | Milliliter  |
| MRL/lpr          | Mausmodell einer entzündlichen Arthritis                                |
| MS               | Multiple Sklerose   |
| n                | Anzahl  |
| NaCl             | Natriumchlorid  |
| NK               | Natürliche Killerzellen   |
| OD               | Optische Dichte   |
| OVA              | Ovalbumin   |
| p                | Signifikanz   |
| PAF-4            | Platelet activating factor-4  |
| PBS              | phosphat buffered saline  |
| PCR              | polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion                   |
| pI               | Isoelektrischer Punkt   |
| PI3K             | Phosphatidylinositol-3-Kinase   |
| PKC              | Proteinkinase C   |
| PLC              | Phospholipase C   |
| PTX              | Pertussis-Toxin   |
| PVDF             | Polyvinyliden-difluorid   |
| RA               | Rheumatoide Arthritis   |
| RANTES           | Regulated on activation, T cell expressed and secreted<br>(CCL5)        |
| RFU              | Relative Fluorescence Units   |
| RNA              | Ribonukleinsäure  |
| RPE              | R-Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff                                   |
| rpm              | Umdrehungen pro Minute  |
| RT               | Reverse Transkriptase oder auch Raumtemperatur                          |
| s                | Sekunden  |
| SCID             | Severe combined Immunodeficiency  |
| SDF-1            | Stromal-derived-factor-1 (CXCL12)                                       |
| SDS              | Sodium dodecyl sulfate  |
| SLE              | Sytemischer Lupus Erythematosus   |
| SSC              | side angle light scatter; Seitwärtsstreulicht bei der FACS-Analyse      |

---

|               |  |
|---------------|--|
| STAT          | signal transducers and activators of transcription |
| TBS           | Tris buffered saline                               |
| Tc            | Zytotoxische T-Zelle                               |
| TCR           | T-Zell-Rezeptor                                    |
| TEMED         | N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine             |
| TGF- $\beta$  | Transforming growth factor $\beta$                 |
| Th            | T-Helfer-Zelle                                     |
| TM            | transmembranär                                     |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-necrosis-factor $\alpha$                     |
| Treg          | Regulatorische T-Zelle                             |
| TRIS          | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                    |
| U             | Units  |
| VCAM-1        | Vascular adhesion molecule-1                       |
| VLA-4         | Very late antigen-4                                |
| vMIP-II       | Virales MIP-II                                     |
| wt            | Wildtyp  |

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Vorbemerkungen</b>   | <b>IV</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>V</b>  |
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Das Immunsystem   | 1         |
| 1.1.1 Th1/Th2-Immunität   | 2         |
| 1.2 Klassifizierung der Chemokine   | 2         |
| 1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren   | 7         |
| 1.3.1 Oligomerisierung von Chemokinen und Bindung an GAGs                             | 8         |
| 1.4 Signalweiterleitung durch Chemokinrezeptoren                                      | 9         |
| 1.5 T-Zellmigration   | 11        |
| 1.6 Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in<br>entzündlichen Erkrankungen | 13        |
| 1.7 Rolle und Funktion von CCR2, CCR5 und CXCR3                                       | 14        |
| 1.7.1 CCR2 und der Ligand MCP-1/CCL2  | 14        |
| 1.7.2 CCR1, CCR5 und RANTES/CCL5  | 15        |
| 1.7.3 CXCR3 und die Liganden CXCL10, CXCL9 und CXCL11                                 | 16        |
| 1.8 Strategien für die Therapie entzündlicher Erkrankungen                            | 17        |
| 1.8.1 Nicht-peptidische Antagonisten  | 18        |
| 1.8.2 Virale Proteine   | 18        |
| 1.8.3 N-terminal modifizierte Chemokine als Antagonisten                              | 19        |
| 1.9 Zielsetzung   | 20        |
| <b>2. Material und Methoden</b>   | <b>21</b> |
| 2.1 Molekularbiologische Methoden   | 22        |
| 2.1.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von RNA                                 | 22        |
| 2.1.2 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von DNA                                 | 22        |
| 2.1.3 Ethanol-fällung von Nucleinsäuren   | 23        |
| 2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 23        |
| Standard-PCR  | 23        |
| RT-PCR  | 25        |
| 2.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren                             | 26        |
| 2.1.6 cDNA-Array  | 27        |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.1.7 | cDNA-Sequenzierung   | 29 |
| 2.1.8 | Aminosäure-Sequenzierung   | 29 |
| 2.2   | Biochemische und Proteinchemische Methoden                           | 30 |
| 2.2.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)                       | 30 |
| 2.2.2 | Silberfärbung von Proteingelen                                       | 31 |
| 2.2.3 | N-Glykosidase-F-Verdau   | 32 |
| 2.2.4 | Heparin-Affinitätschromatographie                                    | 32 |
| 2.2.5 | Konzentrationsbestimmung von Proteinen                               | 33 |
| 2.2.6 | Tangentialfluss-Filtration   | 34 |
| 2.2.7 | Dialyse des Mutein-haltigen <i>Pichia pastoris</i> -Überstandes      | 35 |
| 2.2.8 | Lyophilisierung und Filtration von <i>Pichia pastoris</i> -Überstand | 36 |
| 2.3   | Mikrobiologische Methoden  | 37 |
| 2.3.1 | Kultivierung von <i>E.coli</i>                                       | 37 |
| 2.3.2 | Transformation von <i>E.coli</i>                                     | 37 |
| 2.3.3 | Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i>                              | 38 |
| 2.3.4 | Konstruktion der Proteinexpressionsvektoren                          | 38 |
|       | MCP-1 und MCP-1(1-8)del  | 38 |
|       | Virales MIP-II   | 39 |
|       | I-TAC und I-TAC(1-3)del  | 39 |
| 2.3.5 | <i>Pichia pastoris</i> Transformation und Selektion                  | 40 |
| 2.3.6 | Vektoren: pPIC9 und pPIC9K   | 41 |
| 2.3.7 | Proteinexpression durch <i>Pichia pastoris</i>                       | 43 |
|       | Schüttelkolben-Kultivierung  | 43 |
|       | Hochzelldichte-Kultivierung  | 44 |
| 2.4   | Immunologische Methoden  | 45 |
| 2.4.1 | ELISA  | 45 |
|       | Direkter ELISA   | 45 |
|       | <i>Sandwich</i> -ELISA   | 46 |
| 2.4.2 | Western Blot Analyse und ECL-Detektion                               | 47 |
| 2.5   | Zellbiologische Methoden   | 49 |
| 2.5.1 | Kultivierung von Säugerzellen  | 49 |
| 2.5.2 | Einfrieren und Auftauen von Th1-Zellen                               | 50 |
| 2.5.3 | Stimulierung von Säugerzellen  | 50 |
| 2.5.4 | FACS-Analyse   | 50 |
| 2.5.5 | Kalzium-Mobilisierung  | 52 |
| 2.5.6 | Migration von Th1-Zellen (Chemotaxis)                                | 53 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.6       | <i>In vivo</i> -Anwendungen   | 55        |
| 2.6.1     | Intravitalmikroskopie   | 55        |
| 2.7       | Statistik   | 57        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>58</b> |
| 3.1       | Charakterisierung des T-Helfer-1 Lymphozytenklons IF12  | 58        |
| 3.1.1     | Chemokinrezeptor-mRNA-Nachweis mit RT-PCR   | 58        |
| 3.1.2     | Bestimmung des Chemokinrezeptorprofils mit cDNA-Arrays  | 60        |
| 3.1.3     | Expression von CCR2, CCR5 und CXCR3 auf Proteinebene  | 62        |
| 3.1.4     | Chemokinrezeptorprofil von murinen XS52 und BMMCs   | 63        |
| 3.1.5     | Chemokinprofil von muriner Mesangiumzellen  | 46        |
| 3.2       | Generierung rekombinanter Chemokine und Chemokinrezeptor-Antagonisten in <i>Pichia pastoris</i> | 66        |
| 3.2.1     | Herstellung von murinem MCP-1 und MCP-1(1-8)del   | 66        |
| 3.2.2     | Herstellung von viralem MIP-II  | 67        |
| 3.2.3     | Herstellung von wtl-TAC und I-TAC(1-3)del   | 68        |
| 3.2.4     | Sequenzierung der Antagonisten-cDNAs  | 72        |
| 3.3.      | Expression der Muteine in der methylotrophen Hefe <i>Pichia pastoris</i>                        | 75        |
| 3.3.1     | Schüttelkolben-Kultivierung   | 75        |
| 3.3.2     | Hochzelldichtekultivierung  | 76        |
| 3.3.3     | Western-Blot-Analyse der generierten Muteine  | 76        |
| 3.3.4     | Aminosäure-Sequenzierung (Edman-Abbau)  | 79        |
| 3.4       | Aufreinigung der Muteine  | 81        |
| 3.4.1     | Ionenaustausch-Chromatographie  | 81        |
| 3.4.2     | Heparin-Affinitätschromatographie   | 81        |
| 3.5       | Funktionelle Untersuchungen zur Bioaktivität der Antagonisten                                   | 88        |
| 3.5.1     | Inhibition der Liganden-induzierten Th1-Migration   | 88        |
| 3.5.1.1   | Inhibition der MCP-1-induzierten Migration durch MCP-1(1-8)del                                  | 88        |
| 3.5.1.2   | Inhibition der Th1-Migration durch vMIP-II  | 89        |
| 3.5.1.3   | Inhibition der CXCR3-Liganden-induzierten Migration durch I-TAC(1-3)del                         | 91        |
| 3.5.2     | Bindungsaffinität der CXCR3-Liganden zu ihrem Rezeptor  | 94        |
| 3.5.3     | Effekte von Chemokin-Kombinationen auf die Th1-Migration  | 95        |
| 3.5.4     | Effekte kombinierter Chemokinrezeptor-Antagonisten auf die Th1-Migration                        | 97        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.5.5      | Liganden-induzierte Kalzium-Mobilisierung von Th1-Zellen   | 97         |
| 3.6        | Untersuchungen zur Signalweiterleitung von CXCR3   | 99         |
| 3.6.1      | Internalisierung von CXCR3   | 99         |
| 3.6.2      | Inhibitor-Effekte auf die I-TAC-induzierte Th1-Chemotaxis  | 101        |
| 3.6.3      | Inhibitor-Effekte auf die Kalzium-Mobilisierung in Th1-Zellen  | 103        |
| 3.7        | Anwendung von I-TAC(1-3)del <i>in vivo</i> : Untersuchung der T-Zellmigration im Mausohr mittels Intravitalmikroskopie | 104        |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion</b>  | <b>107</b> |
| 4.1        | Charakterisierung der verwendeten Zelltypen  | 108        |
| 4.2        | Herstellung und Aufreinigung der Chemokinrezeptor-Antagonisten<br>MCP-1(1-8)del, vMIP-II und I-TAC(1-3)del             | 109        |
| 4.3        | Funktionelle Untersuchungen zur Wirkung der Antagonisten   | 116        |
| 4.4        | Signalweiterleitung durch CXCR3  | 119        |
| 4.5        | Einsatz von I-TAC(1-3)del in der Intravitalmikroskopie   | 121        |
| <b>5.</b>  | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>123</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>125</b> |
| <b>7.</b>  | <b>Lebenslauf</b>  | <b>137</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Eigene Veröffentlichungen und Poster</b>  | <b>137</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Danksagung</b>  | <b>139</b> |
| <b>10.</b> | <b>Selbständigkeitserklärung</b>   | <b>140</b> |

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein hochvariables und anpassungsfähiges Abwehrsystem, welches die Aufgabe hat, den Körper vor Mikroorganismen, fremdartigen Molekülen, Toxinen und bösartigen Zellen zu schützen. Hinsichtlich seiner Reaktionsmechanismen unterscheidet man zwischen der angeborenen (natürlichen) Immunität und der erworbenen (adaptiven) Immunität. Die angeborene Immunität wird als unspezifisch oder auch als nichtklonaler Abwehrmechanismus bezeichnet, sie existiert bereits vor dem ersten Kontakt mit Fremdkörpern und bedarf keiner Ausprägung spezifischer Zellklone. Gesunde Menschen besitzen eine Reihe an Abwehrmechanismen gegen Mikroben, einschließlich physikalischer Barrieren (z. B. die Haut), dem Komplementsystem, einem Apparat an antimikrobiellen Enzymen sowie unspezifischer Signalstoffe (Mediatoren) wie Interferone und Interleukine. Auf zellulärer Ebene spielen sowohl Granulozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile), das Monozyten-Makrophagen-System als auch Mastzellen und natürliche Killerzellen (NKs) eine wichtige Rolle, wobei die natürlichen Killerzellen eine verbindende Position zwischen spezifischer und unspezifischer Immunität darstellen. Eine wichtige unspezifische Abwehrreaktion des Körpers ist die Entzündung, zu deren Charakteristika Schwellung, Schmerz, Wärme und Rötung gehören. Sie ermöglicht durch Kombination der humoralen und zellulären Komponenten eine Konzentration der Abwehrmechanismen im Gewebe.

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden die Weichen für die erworbene Immunität gestellt, die eine Spezifität für bestimmte Makromoleküle aufweist. Mit jeder weiteren Antigen-Begegnung erhöhen sich die Stärke und die defensiven Fähigkeiten der Immunantwort. Durch ein spezifisches Zytokinmuster wird die Richtung in eine mehr humorale oder mehr zelluläre Abwehr festgelegt; das Auswandern von Antigen-präsentierenden Zellen in lymphatische Organe resultiert in einer systemischen Immunantwort und anschließend in einem immunologischen Gedächtnis, das die Basis für eine schützende Impfung darstellt. Hierfür ist das adaptive Immunsystem verantwortlich, dem die T- und B-Zellen angehören. Fremdkörper, die eine erworbene Immunantwort auslösen, werden als Antigene bezeichnet. Das T- und B-Zellsystem kann hochspezifisch auf ein jeweiliges Antigen reagieren und klonal expandieren. Die spezifische Immunantwort verstärkt die protektiven Mechanismen der angeborenen Immunität und dirigiert deren Komponenten zum Ort des Antigeneintritts, wodurch die Fähigkeit, Fremdkörper eliminieren zu können, erhöht wird (Burmester et al., 1998).

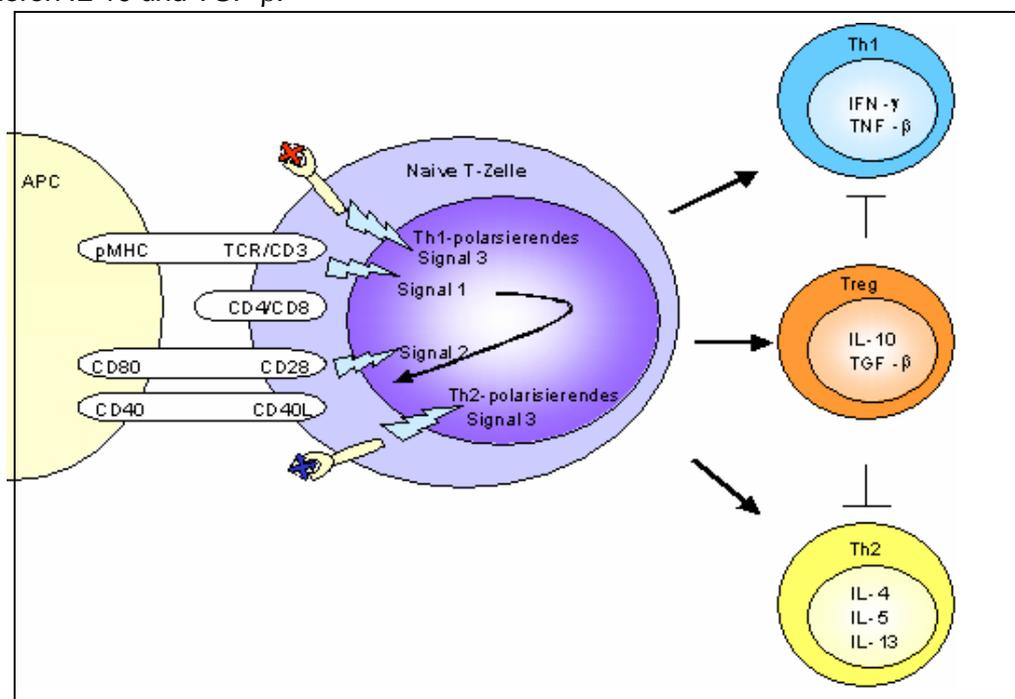
### 1.1.1 Th1/Th2-Zell-Immunität

Lymphozytäre Vorläuferzellen migrieren kontinuierlich aus dem Knochenmark zum Thymus, wo sie sich zu T-Zellen entwickeln. Während dieser Ausbildungsphase im Thymus wird eine große Zahl an T-Zell-Oberflächenmolekülen auf eine streng regulierte Weise an- und ausgeschaltet. Besonderes Augenmerk im Hinblick auf die T-Zellentwicklung gilt den CD4 (*cluster of differentiation* Protein 4) und CD8-Molekülen zusammen mit der CD3-Molekülgruppe, die einen essentiellen Teil des T-Zell-Rezeptorkomplexes ausmachen. CD4 bindet einen invariablen Teil des MHC Klasse II Moleküls (*major histocompatibility complex* = Haupthistokompatibilitätskomplex), während CD8 an einen invariablen Teil des MHC Klasse I Moleküls bindet. CD4 T-Zellen fungieren gewöhnlich als T-Helferzellen, erkennen die von MHC Klasse II Molekülen präsentierten Antigene und regen B-Zellen zur Teilung, Differenzierung und Antikörperproduktion sowie Makrophagen zur erhöhten Aktivität an. CD8 T-Zellen sind gewöhnlich zytotoxische Zellen, erkennen MHC Klasse I-präsentierte Antigene und reagieren mit starker Teilung und Produktion von Zytokinen. Sie töten virusinfizierte und entartete Körperzellen ab. In der frühen T-Zellentwicklung im Thymus exprimieren unreife T-Zellen beide Moleküle, CD4 und CD8 (Burmester, 1998). Treffen sie auf einen passenden T-Zell-Rezeptor sind diese doppelt positiven unreifen T-Zellen in der Lage Antigenpeptide zu erkennen, die entweder durch MHC Klasse I oder MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden. Während der Reifung der T-Zellen im Thymus geht die Expression eines dieser Moleküle verloren, so dass eine entweder CD4- oder CD8-positive T-Zelle entsteht, die jeweils nur Peptide erkennt, die entweder von MHC Klasse I oder von MHC Klasse II Molekülen präsentiert wird.

Im Thymus wird ein sehr individuelles Repertoire von CD4- und CD8-positiven T-Zellen ausgebildet, wobei nur T-Zellen mit moderater Affinität gegenüber dem MHC/Selbstantigenkomplex überleben, während die möglicherweise autoreaktiven T-Zellen mit hoch affinem T-Zellrezeptor (TCR) der Apoptose zugeführt werden. Nach der Auswanderung dieser reifen T-Lymphozyten aus dem Thymus erkennen sie im MHC Molekül präsentiertes Fremdantigen. Die Aktivierung dieser naiven T-Zellen erfordert jedoch neben der MHC/TCR Interaktion ein zweites Signal, die nachfolgende Differenzierung zusätzlich ein drittes Signal. Das erste Signal ist die Präsentation von prozessierten Antigenen auf den MHC-Komplexen von APCs (*antigen presenting cells* = Antigen-präsentierende Zellen). Dieser MHC-Komplex bindet anschließend an den TCR und den CD4- bzw. CD8-Korezeptor auf den T-Zellen. Dieser Bindung folgt eine hauptsächlich durch CD28-vermittelte zweite Kostimulation zwischen T-Zellen und APCs (Croft, 1997), die zur erhöhten Produktion von IL-2 führt, welche die klonale Expansion der T-Lymphozyten erst ermöglicht. Es ist heute eine Vielzahl von kostimulatorischen Molekülen bekannt, die bei der T-Zell-Aktivierung unterschiedliche Aufgaben erfüllen, wie CD80/B7.1, CD86/B7.2, CD154 (CD40-Ligand), ICOS (*inducible co-stimulator*) etc. Zudem sind noch verschiedenste Adhäsionsmoleküle beteiligt, die einen engen Kontakt zwischen den Zellen

herstellen und in die Formation einer sogenannten immunologischen Synapse münden (Bromley et al., 2001).

Unter den diversen Typen von Effektor-T-Zellen, die aus naiven T-Zellen hervorgehen, werden zwei Typen von T-Zellen (Typ 1 und 2 oder Th1 und Th2, spezifisch für polarisierte CD4 T-Zellen) aufgrund ihrer Zytokinproduktion unterschieden. Th2-Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-5 (daneben IL-3, IL-9, IL-13) und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern, während Th1-Zellen vor allem IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie GM-CSF sezernieren und über Makrophagen-Aktivierung vor allem zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen führen (Abb. 1-1) (Abbas et al., 1996). Beide Th-Zellgruppen sind in der Lage, durch die eigenen Zytokine die jeweils andere Zellgruppe in ihrer Aktivierung zu inhibieren. Polarisierte T-Zellen sind in spezifische Effektorfunktionen involviert und spielen eine wichtige Rolle im Fortschreiten vieler Erkrankungen. Regulatorische T-Zellen (Treg) sind an der Toleranzentwicklung des Immunsystems beteiligt und exprimieren IL-10 und TGF- $\beta$ .



**Abb. 1-1: T-Zell-Stimulation und T-Helfer-1 (Th1)/Th2-Zell-Polarisierung erfordert drei Signale von APCs.** Signal 1 ist das Antigen-spezifische Signal, welches über MHC Klasse-assoziierte Peptide durch T-Zell-Rezeptor-Vermittlung übertragen wird. Signal 2 ist das kostimulatorische Signal, hauptsächlich vermittelt durch CD28-Signalisierung. Signal 3 ist ein polarisierendes Signal, welches durch verschiedene lösliche oder membranständige Faktoren, wie IL-12 und der CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2/MCP-1), ausgelöst wird, die jeweils die Entwicklung von Th1- oder Th2-Zellen unterstützen. TCR: T-Zell-Rezeptor; pMHC: peptid-beladenes MHC-Molekül; CD (*cluster of differentiation*); CD40L: CD40-Ligand (verändert von Kapsenberg, 2003).

In den letzten Jahren der Chemokinforschung wurde gezeigt, dass Th1- und Th2-Zellen ein bestimmtes Muster an Chemokinrezeptoren (CR) exprimieren. Th1-Zellen exprimieren vermehrt CCR5 und CXCR3 (Th1-assoziierte Chemokinrezeptoren), während Th2-Zellen vermehrt CCR3, CCR4 und CCR8 auf ihrer Oberfläche tragen (Th2-assoziierte CR) (Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1998). In Patienten mit Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose, zwei Th1-

vermittelten Erkrankungen, exprimieren fast alle einwandernden T-Zellen CCR5 und CXCR3 (Qin et al., 1998). Weiterhin exprimieren die T-Zell-Subtypen selektiv bestimmte Adhäsionsmoleküle, denen eine wichtige Rolle zukommt. Th1-Zellen exprimieren eine ganze Reihe an Selektinliganden. P- und E-Selektin, welche in entzündetem Endothel vorkommen, und ihre Liganden, P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) und CD24, sowie E-Selektin Ligand-1 (ESL-1), die von Leukozyten exprimiert werden, sind für das Rollen von Th1-Zellen und deren Migration zu entzündetem Gewebe wichtig. Die Expression des Enzyms Fucosyltransferase VII ist dabei notwendig für die Zellen, um Selektinliganden synthetisieren zu können. Dieses Enzym wird durch Interleukin-12 induziert, welches die Differenzierung von Th1-Zellen vorantreibt, während das Versetzen von T-Zellen mit dem Th2-assoziierten Zytokin Interleukin-4 zu einer Verminderung der Selektinliganden-Expression führt. Es existieren ältere Untersuchungen zur unterschiedlichen Rolle von Adhäsionsmolekülen. Aus diesen Studien zu Chemokinrezeptoren wurde gefolgert, dass Th1- und Th2-Zellen ein durchaus unterschiedliches Migrationspotential aufweisen (Austrup et al., 1997).

Das Vorhandensein Th1-spezifischer versus Th2-spezifischer Eigenschaften ist ein interessanter Ausgangspunkt, denn es könnte die Einflussnahme auf eine geeignete Chemokinexpression im Gewebe Th1- oder Th2-vermittelter Entzündungen ermöglichen. Generell lässt sich sagen, dass eine Notwendigkeit zur Heterogenität zwischen polarisierten und nicht polarisierten Subtypen besteht, um Gedächtnis- oder Effektorzellen in verschiedenste Gewebe des Körpers zu dirigieren. Daher postulierte man, dass das Expressionsprofil von Chemokinrezeptoren von polarisierten und nicht polarisierten Zellen komplex und heterogen sein muss, um dieses differenzierte Migrieren zu Geweben *in vivo* ermöglichen zu können (Kim et al., 2001).

## 1.2 Klassifizierung der Chemokine

Chemokine (oder **chemo**attraktive Zytokine) stellen eine komplexe Superfamilie von kleinen, sekretierten Polypeptiden mit einer Länge von etwa 70 bis 130 Aminosäuren (8-15 kDa) dar, die eine 20 bis 25 Aminosäure lange Signalsequenz enthalten, welche während der Sekretion abgespalten wird. Sie wurden erstmals wegen ihrer Fähigkeit Leukozytenmigration hervorzurufen entdeckt (Baggiolini et al., 1994 und 1997). Ihre biologische Rolle geht jedoch über die Funktion als chemischer Lockstoff zu wirken hinaus, seitdem gezeigt wurde, dass sie in viele andere biologische Prozesse einschließlich Wachstumsregulierung (Luster et al., 1998), T-Zell-Aktivierung (Hasegawa et al., 2001), Hämatopoese (Horuk, 2001) Angiogenese (Broxmeyer, 2001) etc. involviert sind. Viele krankhafte Veränderungen konnten in der Vergangenheit mit einer Disregulation des Chemokin-Netzwerkes in Verbindung gebracht werden (Kapitel 1.6).

Das stetige Wachstum der Chemokinfamilie in den letzten Jahren, die inzwischen aus über 50 Chemokinen und mindestens 19 Chemokinrezeptoren beim Menschen besteht, machte eine Standardisierung und Überarbeitung der Chemokin-Nomenklatur notwendig (Tabelle 1).

Tabelle 1: Die Chemokin-Superfamilie

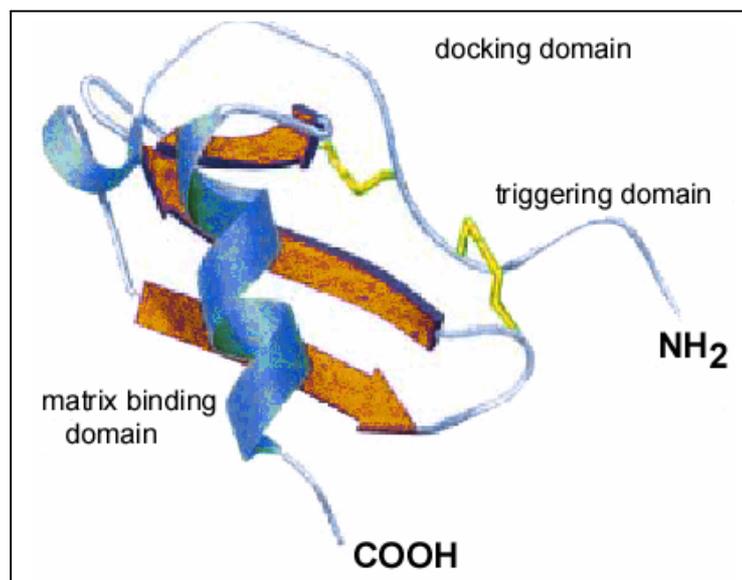
| Humanes Chemokin          | Alternativer Name                            | Maus-Homolog                    | Rezeptor    | Expressionsprofil |
|---------------------------|--|---------------------------------|-------------|-------------------|
| <b>CXC oder (alpha-)</b>  |  |                                 |             |                   |
| CXCL1                     | GRO $\alpha$ , MGSA, NAP-3                   | N51/KC, MIP-2                   | CXCR2, R1   | induzierbar       |
| CXCL2                     | GRO $\beta$ , MIP-2 $\alpha$                 | GRO/KC                          | CXCR2, R1   | Induzierbar       |
| CXCL3                     | GRO $\gamma$ , MIP-2 $\beta$                 | GRO/KC                          | CXCR2, R1   | Induzierbar       |
| CXCL4                     | PF-4, SCYB-4                                 | PF-4                            | Unbekannt   | Induzierbar       |
| CXCL5                     | ENA-78, SCYB-5                               | Unbekannt                       | CXCR2; R1   | Induzierbar       |
| CXCL6                     | GCP-2, SCYB-6                                | Unbekannt                       | CXCR2       | Induzierbar       |
| CXCL7                     | NAP-2  | Unbekannt                       | CXCR2, R1   | Induzierbar       |
| CXCL8                     | IL-8, SCYB-8                                 | Unbekannt                       | CXCR1, R2   | Induzierbar       |
| CXCL9                     | MIG  | MIG                             | CXCR3       | Induzierbar       |
| CXCL10                    | IP-10  | CRG-2, IP-10                    | CXCR3       | Induzierbar       |
| CXCL11                    | I-TAC  | I-TAC                           | CXCR3       | Induzierbar       |
| CXCL12                    | SDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\beta$               | SDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\beta$  | CXCR4       | konstitutiv       |
| CXCL13                    | BCA-1, BLC                                   | BLC                             | CXCR5       | konstitutiv       |
| CXCL14                    | BRAK, BMAC                                   | BRAK, BMAC                      | Unbekannt   | Beides            |
| CXCL15                    | Kein   | Lungkine                        | Unbekannt   | konstitutiv       |
| CXCL16                    | CXCL16                                       | CXCL16                          | CXCR6       | konstitutiv       |
| <b>CC oder (beta-)</b>    |  |                                 |             |                   |
| CCL1                      | I-309  | TCA-3                           | CCR8        | Induzierbar       |
| CCL2                      | MCP-1  | JE                              | CCR2        | Induzierbar       |
| CCL3                      | MIP-1 $\alpha$ , LD78 $\alpha$               | MIP-1 $\alpha$ , LD78 $\alpha$  | CCR1,5      | Induzierbar       |
| CCL4                      | MIP-1 $\beta$                                | MIP-1 $\beta$                   | CCR5,8      | Induzierbar       |
| CCL5                      | RANTES                                       | RANTES                          | CCR1, 3, 5  | Induzierbar       |
| CCL6                      | Kein   | C10, MRP-1                      | Unbekannt   | Induzierbar       |
| CCL7                      | MCP-3  | MARC/FIC                        | CCR1,2,3,   | Induzierbar       |
| CCL8                      | MCP-2  | Kein                            | CCR1,2,3,5  | Induzierbar       |
| CCL9                      | Kein   | MRP-2, MIP-1 $\gamma$           | Unbekannt   | Induzierbar       |
| CCL10                     | Kein   | Kein                            | Unbekannt   |                   |
| CCL11                     | Eotaxin-1                                    | Eotaxin                         | CCR3        | Induzierbar       |
| CCL12                     | Kein   | MCP-5                           | CCR2        | Induzierbar       |
| CCL13                     | MCP-4  | Unbekannt                       | CCR1,2,3    | Induzierbar       |
| CCL14                     | HCC-1  | Unbekannt                       | CCR1,5      | Konstitutiv       |
| CCL15                     | HCC-2, leukotaktin-1, MIP-5                  | Unbekannt                       | CCR1,3      | Konstitutiv       |
| CCL16                     | HCC-4, monotactin-1, LEC                     | Unbekannt                       | CCR1        | Beides            |
| CCL17                     | TARC   | TARC                            | CCR4,8      | Induzierbar       |
| CCL18                     | DC-CK-1, PARC, MIP-4                         | Unbekannt                       | Unbekannt   | Konstitutiv       |
| CCL19                     | MIP-3 $\beta$ , ELC, exodus-3, ck $\beta$ 11 | MIP-3 $\beta$ , ELC, exodus-3   | CCR7        | Konstitutiv       |
| CCL20                     | MIP-3 $\alpha$ , LARC, exodus-1              | MIP-3 $\alpha$ , LARC, exodus-1 | CCR6        | Konstitutiv       |
| CCL21                     | 6Ckine, SLC, exodus-2                        | 6Ckine, SLC, TCA-4              | CCR7, CXCR3 | Konstitutiv       |
| CCL22                     | MDC  | MDC                             | CCR4        | Beides            |
| CCL23                     | MPIF-1, ck $\beta$ 8                         | Unbekannt                       | CCR1        | Konstitutiv       |
| CCL24                     | MPIF-2, eotaxin-2, ck $\beta$ 6              | MPIF-2, eotaxin-2               | CCR3        | Induzierbar       |
| CCL25                     | TECK   | TECK                            | CCR9        | Konstitutiv       |
| CCL26                     | Eotaxin-3, MIP-4 $\alpha$ , IMAC             | Unbekannt                       | CCR3, 10    | Induzierbar       |
| CCL27                     | CTACK, Eskine, Skinkine                      | CTACK, Eskine, Skinkine         | CCR10       | Konstitutiv       |
| CCL28                     | CCL28, MEC                                   | CCL28, MEC                      | CCR3, 10    | Beides            |
| <b>C oder (gamma-)</b>    |  |                                 |             |                   |
| XCL1                      | Lymphotactin $\alpha$ , SMC-1 $\alpha$       | Lymphotactin                    | XCR1        | Induzierbar       |
| XCL2                      | Lymphotactin $\beta$ , SCM-1 $\beta$         |                                 | XCR1        | Induzierbar       |
| <b>CX3C oder (delta-)</b> |  |                                 |             |                   |
| CX3CL1                    | Fraktalkin                                   | Fraktalkin, neurotactin         | CX3CR1      | Beides            |

Daten verändert von Seminars in Immunology 15 (2003) 1-4

Die Expression der Chemokine kann grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Chemokine, die am homöostatischen Wandern von Zellen zum Lymphsystem beteiligt sind (*homing chemokines*), wie SDF-1/CXCL12, SLC/CCL21, ELC/CCL19 und TECK/CCL25, werden konstitutiv von vielen

verschiedenen Zelltypen gewebespezifisch exprimiert und wirken am homöostatischen *Homing* in diesen Arealen mit. Sie sind in die Erhaltung und die Direktion der Chemotaxis von Zellen involviert, die hauptsächlich zur erworbenen Immunität, während der Hämatopoese, Antigenerkennung in sekundären lymphatischen Organen und Überwachung des Immunsystems, gehören. Homöostatische Chemokine werden in einer kontrollierten Kleinstumwelt von beiden lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben produziert. Im Gegensatz dazu wird die Expression entzündlicher (pro-inflammatorischer) Chemokine, wie MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 oder IP-10/CXCL10, kurzzeitig und unter spezifischen Bedingungen durch anwesende oder infiltrierende Zellen induziert, die wiederum durch pro-entzündliche Zytokine oder infolge eines Kontaktes mit einem Fremdkörper aktiviert wurden. Diese Chemokine sind in der Lage Effektorzellen, wie Monozyten, T-Lymphozyten und Granulozyten zum Ort der Entzündung zu rekrutieren.

Man nimmt heute an, dass die Chemokine aus drei oder vier entwicklungs geschichtlich konservierten Genen hervorgehen und man unterteilt sie grob in vier Unterfamilien. Die zwei Hauptfamilien, CXC- und CC- Chemokine (auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Chemokine genannt), unterscheiden sich hinsichtlich der Position der zwei ersten Cysteine, die durch eine Aminosäure getrennt (CXC) oder benachbart sind (CC). Diese Cysteine bilden Disulfidbrücken aus (Cys1→Cys3, Cys2→Cys4), welche die Proteinstruktur stabilisieren (Baggiolini, 2001). Zwei Variationen des Chemokinstruktur-Dogmas sind die Chemokine Lymphotaktin, das zwei statt vier konservierte Cysteine enthält (XC- oder  $\gamma$ -Chemokin), und Fraktalkin, ein membrangebundenes Mucin mit einer N-terminalen Chemokin-ähnlichen Domäne, welches drei Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinen enthält (CX3C- oder  $\delta$ -Chemokin). CXC-Chemokine können weiter in ELR-enthaltende und nicht-ELR-enthaltende Chemokine unterteilt werden, abhängig von der Anwesenheit eines ELR (Glutamin-Leuzin-Arginin)-Motivs vor der CXC-Signatur. Beim Menschen befinden sich die Gene der CXC-Chemokine auf Chromosom 4, die der CC-Chemokine auf Chromosom 17. Eine basische Matrix-Domäne, die sich am C-Terminus der Chemokine befindet, ermöglicht ihnen die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix. Für CC- und CXC-Chemokine werden zwei funktionelle Domänen beschrieben, die in Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktionen involviert sind. Eine sogenannte *loop*-Region, auch *docking domain* genannt, nahe am zweiten konservierten Cystein, ist für die Bindung des Chemokins an den Rezeptor verantwortlich. Diese Interaktionen schränken die Mobilität des Chemokins etwas ein und erleichtern wahrscheinlich die richtige Orientierung der N-terminalen Signalisierungs-Domäne, *triggering*-Domäne, welche den G-Protein-gekoppelten Rezeptor letztlich aktiviert (Abb. 1-2) (Crump et al., 1997).



**Abb. 1-2: Schematisches Strukturmodell eines CC-Chemokins.** Drei Domänen sind für die Funktion eines Chemokins wichtig. Die *triggering*-Domäne, welche die ersten Aminosäuren N-terminal bis zum ersten Cystein beinhaltet, aktiviert den Chemokinrezeptor. Die *docking*-Domäne, die Schleifenregion nach dem zweiten Cystein, ist für die Chemokinbindung verantwortlich und die Matrix-bindende Domäne ermöglicht die Bindung an Glukosaminoglykane der extrazellulären Matrix der Zelle (verändert nach Baggiolini et al., 1997).

### 1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine übermitteln ihre biologischen Effekte durch Interaktion mit spezifischen hoch und niedrig affinen Chemokinrezeptoren, die zur Familie der heterotrimeren, siebentransmembranären (7-TM) G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs= *G protein-coupled receptors*) gehören. Chemokinrezeptoren sind typischerweise 370-430 Aminosäuren lang, zeigen eine 25-80%ige Homologie unter allen bekannten humanen Chemokinrezeptoren, teilen sich eine hochkonservierte *DRYLAIV* Aminosäuresequenz in der zweiten intrazellulären Schleifenregion und gehören der Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCR an (Murphy, 1994). Zusätzlich weisen alle Chemokinrezeptoren zwei konservierte Cysteine, eins in der N-terminalen Domäne und das andere in der dritten extrazellulären Schleifenregion, auf, von denen man annimmt, dass sie eine Disulfidbrücke ausbilden und wichtig für die Konformation der Liganden-Bindungstasche sind. Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren ist der der Chemokinfamilien angelehnt, sie werden mit CCR1-11, CXCR1-6, XCR1 und CX3CR1 bezeichnet. Die Rezeptoren, die zu den inflammatorischen Chemokinen gehören, werden vorzugsweise von mehr als einem Liganden gebunden, während die für das *Homing* zuständigen Rezeptoren hauptsächlich einen einzigen Liganden besitzen. Der cytoplasmatische Teil des Rezeptors enthält konservierte Serin- und Threonin-Reste, die bei Rezeptorbindung phosphoryliert werden. Die 7-Transmembran-Domänen sind  $\alpha$ -helikal, und drei intrazelluläre sowie drei extrazelluläre Schleifen verbinden die sieben Domänen. Eine Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten Schleifenregion verleiht dem

Rezeptor eine gewisse Starrheit inmitten der Lipiddoppelschicht, und eine zwischen dem N-terminalen Ende und der dritten extrazellulären Schleife generierte Tasche bildet die Liganden-Bindungsdomäne. Die große Ähnlichkeit der transmembranären Regionen der Chemokinrezeptoren und der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren lässt auf einen gemeinsamen Liganden-induzierten Aktivierungsmechanismus schließen. Dennoch besteht eine große strukturelle Diversität in der extrazellulären Region, so dass in die strukturelle Anlagerung eines Rezeptors an seinen Liganden sehr wahrscheinlich sowohl eine Sequenzspezifität in der extrazellulären Domäne als auch in der transmembranären Region involviert ist, da letztere eine Bindungstasche für kleine Liganden bereitstellt (Ji et al., 1998).

### 1.3.1 Oligomerisierung von Chemokinen und Bindung an GAGs

Zusätzlich zur Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren binden Chemokine auch an gelöste Glukosaminoglykane (GAGs) (Wagner et al., 1998) und an immobilisierte GAGs auf Zelloberflächen und auf der extrazellulären Matrix (EM) (Rot, 1993). Es wurde vermutet, dass die Immobilisierung der Chemokine durch Interaktion mit GAGs die Bildung eines haptotaktischen Chemokingradienten vereinfacht und ihre Konzentration am Produktionsort erhöht. Die Interaktion mit GAGs könnte über die Rezeptor-definierte Wirkung hinaus eine erweiterte Form der Spezifität und Kontrolle der Migration darstellen, durch eine selektive Bindung von Chemokinen an verschiedenen Typen von GAGs und deren Isoformen (Kuschert et al., 1999; Shriver et al., 2002; Middleton et al., 2002). Strukturell handelt es sich bei GAGs um lineare Polysaccharide, die sich wiederholende Disaccharidsequenzen enthalten, dessen N- und O-Sulfatierungen zu einem enormen Grad an Diversität führen. Die am häufigsten vorkommenden GAGs sind Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratinsulfat und Hyaluronsäure. Die negative Nettoladung der GAGs vereinfacht die Interaktion mit den hauptsächlich basischen Chemokinen. Die Affinität verschiedener Chemokine zu verschiedenen Typen von GAGs ist dabei variabel. Es wurde kürzlich gezeigt, dass die Bindung an GAGs essentiell für Migration von MCP1/CCL2, RANTES/CCL5 und MIP-1 $\beta$ /CCL4 *in vivo* ist. Einige Studien zeigen, dass manche Chemokine Dimere oder Tetramere in Lösung ausbilden, während andere Chemokine große Oligomere formen, die Massen von 100 bis 200 kDa erreichen (Czaplewski et al., 1999). Es wurde weiterhin beobachtet, dass obwohl einige Chemokine Dimere ausbilden, die Oligomerisierung nicht erforderlich für die Rezeptorbindung und Chemotaxis *in vitro* ist (Laurence et al., 2000). Jedoch in der *in vivo*-Situation führt eine Bindung an GAGs bei RANTES/CCL5 zu einer Oligomerisierung, und diese Oligomerisierung ist erforderlich für die Zellrekrutierung (Lau et al., 2004). Für MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 (Handel et al., 1996), IL-8/CXCL8 und IP-10/CXCL10 (Booth et al., 2002) wurde beobachtet, dass sie an immobilisiertem Heparin oligomerisieren und als Dimere oder Tetramere in Lösung vorliegen (Hoogewerf et al., 1997).

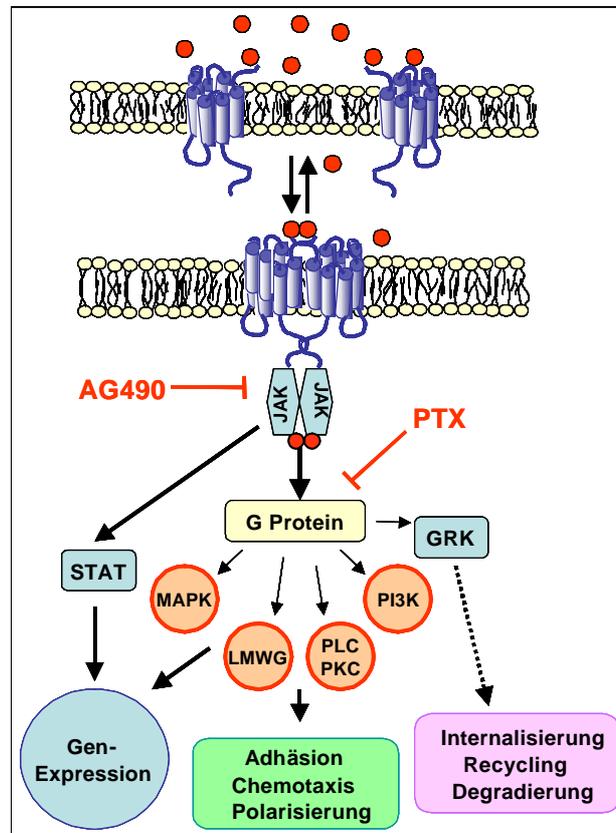
Andere Studien zur Oligomerisierung von MCP-1/CCL2 und RANTES/CCL5 ergaben, dass Aminosäurereste, die für die Rezeptorbindung wichtig waren auch für die Bindung an GAGs verantwortlich sind und, dass daher eine gleichzeitige Interaktion mit dem Rezeptor und den GAGs auszuschließen ist. Die Oligomerisierung könnte einen möglichen Mechanismus der Chemokine darstellen, um mit einem Teil der Moleküle mit GAGs zu interagieren und mit dem anderen Teil gleichzeitig die Rezeptorbindung zuzulassen (Lau et al., 2004). Eine Oligomerisierung könnte zudem verhindern, dass die Chemokine unter Flussbedingungen vom Produktionsort weggeschwemmt werden und unter einen Schwellenwert verdünnt werden, bei dem eine Rezeptorbindung nicht mehr erfolgt.

## 1.4 Signalweiterleitung durch Chemokinrezeptoren

Klassischer Weise erfordert die Signalweiterleitung durch Chemokinrezeptoren, initiiert durch die Bindung eines Chemokins, die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Signalwege, und die Mehrheit der Rezeptorfunktionen wird durch die Behandlung mit *Bordetella pertussis*-Toxin (PTX) gehemmt. Infolge der Rezeptoraktivierung dissoziiert das heterotrimere  $G\alpha\beta\gamma$ -Protein in seinen  $G\beta\gamma$ -Untereinheitenkomplex und seine GTP-gebundene  $G\alpha_i$ -Untereinheit. Eine physikalische Assoziation der  $G\alpha_i$ -Untereinheit mit einigen Chemokinrezeptoren wurde für CXCR1 (Damaj et al., 1996), CCR2 (Mellado et al. 1998), CCR5 (Rodriguez-Frade et al., 1999) und CXCR4 (Vila-Coro et al., 1999) nach Aktivierung durch jeweils IL-8, MCP-1, RANTES und SDF-1 $\alpha$  beschrieben. Studien über die Signalweiterleitung bei CC-Chemokinrezeptoren zeigten eine potente Agonisten-unabhängige Inhibierung der Adenylylzyklase und eine Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium, übereinstimmend mit der Rezeptorassoziation von  $G\alpha_i$  (Myers et al., 1995). In einigen Untersuchungen war PTX nicht in der Lage, die Kalziumantwort ganz zu unterdrücken, was auf eine Signalübermittlung über andere Untereinheiten als  $G\alpha_i$  schließen lässt, z.B. über  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$ ,  $G\alpha_{14}$  und  $G\alpha_{16}$  (Smit et al., 2003). Die Signalweiterleitung über diese verschiedenen G-Proteine ist bisher noch unzureichend geklärt.

Für die  $G\alpha_i$ -Untereinheit ist bekannt, dass sie über Interaktion mit den Regionen der intrazellulären Schleifen an den Rezeptor bindet (Arai et al., 1996). Dies ist eine Folge aus Konformationsänderungen des Rezeptors infolge der Ligandenbindung, Janus-Kinase- (Jak-) Anlagerung und anschließender Phosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptors. Die  $G\alpha_i$ -Untereinheit vermittelt die Aktivierung der Phospholipase-C (PLC), was zur Bildung von Inositol-1, 4, 5- Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) führt. IP<sub>3</sub> wiederum bindet an seinen Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum und mobilisiert Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) aus intrazellulären Speichern. Ca<sup>2+</sup> und DAG sind in der Lage verschiedene Proteinkinase C (PKC)-Isoformen zu aktivieren, die ihrerseits zur Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionskaskade führen (Jiang et al., 1996). CC-Chemokine können zudem die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aktivieren und zur

Freisetzung von Arachidonsäure in humanen Monocyten führen. PLA<sub>2</sub>-Inhibitoren vermindern die Chemokin-induzierte Monozytenmigration nachweislich in einer konzentrationsabhängigen Weise (Locati et al., 1994).



**Abb. 1-4: Schematisches Modell über die Aktivierung der verschiedenen Signalwege infolge der Chemokinbindung an seinen Rezeptor.** Die Abbildung zeigt einige der in diese Signalwege involvierten Moleküle und deren Effekte auf die Zelle. Jak: Janus-Kinase, MAPK: MAP-Kinase, LMWG: *Low molecular weight G-proteins* (Niedermolekulare G-Proteine), PLC: Phospholipase C, PKC: Proteinkinase C, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (verändert von M. Mellado et al., 2001).

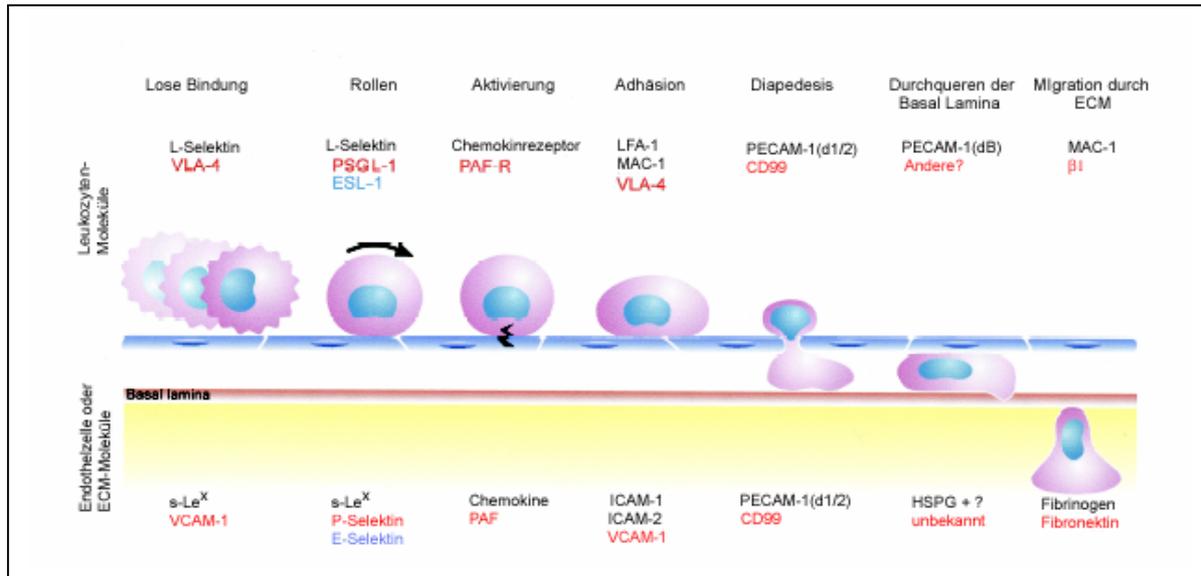
Wenn auch nicht alle, so initiieren manche Chemokinrezeptoren, wie andere G Protein-gekoppelte Rezeptoren, ihre Liganden-induzierte Signaltransduktion durch Rezeptor-Dimerisierung (Abb. 1-4). Diese Dimerisierung wurde als erstes für CCR2, den MCP-1 Rezeptor, gezeigt und später auch für CCR5 und CXCR4 bestätigt (Rodriguez-Frade et al., 1999; Vila-Coro et al., 1999). Für den Rezeptor CXCR2 wurde sogar eine Hetero-Dimerisierung mit dem Rezeptor CCR2 (Lowman et al, 1997) beschrieben.

Die Rezeptor-Dimerisierung resultiert in eine direkte Aktivierung des Tyrosinkinase-Signalweges, wie der Janus-Kinase (Jak/STAT), welche unabhängig von G Protein-vermittelten Signalen erfolgen kann (Williams, 1999). Zudem können Chemokine die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) anschalten, was zur Freisetzung von Lipiden führt, die als *second messenger* für nachfolgende Signalwege, wie z. B. Proteinkinase C (PKC), AKT und Ras-Signalwege fungieren. Eine Aktivierung dieser Kaskaden ist verknüpft mit vermehrter Integrihaftung, Zellmigration und der Polarisierung der Zelle. Weiterhin kann die Chemokinstimulierung zur Phosphorylierung von Serine/Threoninresten durch G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) führen, die bei der

Regulation der Chemokinrezeptor-Aktivität durch Desensitivierung eine Rolle spielen, wie für CCR2 gezeigt wurde (Abb. 1-4) (Aragay et al., 1998).

## 1.5 T-Zellmigration

Die bei T- und B-Zellen hoch spezifische Rezeptor-vermittelte Erkennung ist eine charakteristische Eigenschaft der erworbenen Immunität. Sie führt jedoch zu einer Verzögerung ihrer Reaktionszeit aufgrund der notwendigen klonalen Expansion (Vervielfachung) und Differenzierung der beteiligten Moleküle. Um dennoch sich rapide replizierende Parasiten überwältigen zu können, muss die Immunantwort der erworbenen Immunität aufs Vollste ausgeschöpft werden. Dies erfordert einerseits einen effektiven Mechanismus der Antigenpräsentation zu so vielen Lymphozyten wie möglich, um sicher zu stellen, dass alle Zellen mit geeigneten Rezeptoren aktiviert werden, andererseits muss es einen effizienten Mechanismus geben, nachdem eine Antigen-induzierte Signaltransduktion und Vervielfachung eingetreten ist, der zur schnellen Ansammlung der generierten Effektorzellen am Ort des Mikrobeneintritts führt. Hierfür müssen Lymphozyten in der Lage sein, in einer hoch regulierten Weise zu wandern, die ein komplexes Set an Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen und deren Liganden, Chemokinen und deren Rezeptoren beinhaltet. Die gerichtete Wanderung von Leukozyten in Richtung eines Gradienten wird als Chemotaxis bezeichnet. Es handelt sich hierbei um einen sehr komplexen, mehrstufigen Prozess, der folgende Schritte beinhaltet: (1) das Rollen, (2) die feste Adhäsion, (3) die Transmigration oder Diapedesis und schlussendlich die Verstärkung der immunologischen Antwort (4) (Abbildung 1-5). Der erste Schritt der Chemotaxis ist das kurzzeitige Anhaften und die damit verlangsamte Flussbewegung der Leukozyten an der Endothelwand (Rollen), eine Interaktion, die hauptsächlich durch Selektine vermittelt wird. T-Zellen exprimieren sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) Reste-tragende Glykoproteine, welche als Liganden für E- und P-Selektine fungieren, die wiederum von Endothelzellen auf der Oberfläche getragen werden (Varki, 1994). Naive und Gedächtnis-T-Zellen exprimieren L-Selektin, welches an L-Selektinliganden auf endothelialen Zellen bindet. Neben dem Selektin-vermittelten Rollen spielt ein anderes Molekül, VLA-4 (*very late antigen-4*, CD49d/CD29) genannt, bei diesem Schritt eine wichtige Rolle. VLA-4 ist ein heterodimerer Adhäsionsrezeptor der Leukozyten, der zur Integrinfamilie gehört und an VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*) bindet, welches von Endothelzellen exprimiert wird. Anschließend an das kurzweilige Selektin- und VLA-4-vermittelte Rollen werden die Leukozyten durch Chemokine aktiviert und adhären fest über Haftung durch  $\beta_2$ -Integrine, einschließlich z.B. LFA-1 (CD11a/CD18), und Mitglieder der Immunglobulinfamilie, wie ICAM-1 (CD54), an das Endothel (Griffiths et al., 1998).



**Abb. 1-5: Die sequentiellen Schritte der Leukozyten-Emigration werden von spezifischen Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothelzellen kontrolliert.** Für jeden Schritt sind die interagierenden Paare von Adhäsionsmolekülen, Liganden oder Gegenrezeptoren von Leukozyten und Endothelzellen oder Extrazellulärer Matrix in der gleichen Farbe dargestellt. Bei der losen Bindung sollen die Zacken auf dem Leukozyten die Mikrovilli darstellen, die L-Selektin oder VLA-4 tragen. Der schwarze Blitz im Schritt Aktivierung repräsentiert das Signal der Leukozytenaktivierung und Integrinbildung induziert durch Signale des Endothels oder der Endotheloberfläche via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. ESL: E-Selektin-Ligand; HSPG: Heparansulfat-Proteoglykan; ICAM: *intercellular adhesion molecule*; LFA: *leukocyte function associated antigen*; PAF: *platelet activating factor*; PAF-R: PAF-Rezeptor; PECAM-1: *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*; PECAM-1 (d1/2): Interaktion beinhaltet Immunoglobulin-Domäne 1 und/oder 2 von PECAM-1; PECAM-1 (d6): Interaktion beinhaltet Immunoglobulin-Domäne 6 von PECAM-1; PSGL: P-Selektin-Glykoprotein-Ligand; s-Lex: *sialyl-Lewisx carbohydrate antigen*; VLA: *very late antigen* (verändert von William A. Muller, Laboratory Investigation, 2002).

Die Chemokin-induzierte Aktivierung der Zellen resultiert in eine Konformationsänderung der Integrine, wodurch sich deren Affinität zum jeweiligen Liganden erhöht, welches die Voraussetzung für eine feste Adhäsion und anschließende Transmigration ist. Haben sie schließlich den Ort der Entzündung erreicht, unterstützen die Immunzellen die Entzündungsreaktion durch anhaltende Produktion von Chemokinen.

Um eine gerichtete Migration durchführen zu können, ist die Polarisierung der Zelle notwendig. Die Zellpolarisierung ist wichtig für Prozesse wie Zelldifferenzierung, Antigen-Präsentation, Zellkontaktierung und Migration (Sanchez-Madrid et al., 1999). Chemokine haben bei der Polarisierung eine wichtige Rolle. Die sich fortbewegende T-Zelle zeigt morphologische und funktionelle Charakteristika, wie sie bei Amöben bekannt sind. Ihre Form wird auch als handspiegel-förmig bezeichnet. Anhand der Morphologie unterscheidet man drei Bereiche der Zelle: das so genannte *leading edge* (richtungsgebende Zellfront), gefolgt vom Zellkörper mit Nukleus und dem für die Rückwärtsausrichtung wichtigen Uropod (Zellende). Die polarisierte Organisation von migrierenden T-Lymphozyten scheint zumindest zu einem Teil durch einen Aktin-Zyklus koordiniert zu werden: die Aktin-Polymerisation am *leading edge* drückt die Zellfront vorwärts und filamentöses Aktin bewegt sich nahe an der Membran Richtung Zellende. Über die

Ausbildung von Lamellopodien und Filopodien durch Aktin-Polarisierung an der Zellfront adhärirt die Zelle auf dem Untergrund und vermittelt die Richtung (Samstag et al., 2004).

Neuere Studien weisen der PI3K eine essentielle Funktion bei der Amplifizierung der intrazellulären Signalasymmetrie zu, die der Zelle eine Polarisierung und die Ausbildung des *leading edge* ermöglicht (Chung et al., 2001). Durch ein chemotaktisches Signal, wie z.B. die Stimulierung mit MCP-1/CCL2, wird an der Zellfront rasch die PI3-Kinase aktiviert, die zur Bildung von PIP3 (Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphat) führt. Neben der PI3-Kinase sind weitere PI3K-Effektormoleküle wie Rho, Rac (GTPasen) und Cdc24 (*cell division control protein-24*) in die Signalweiterleitung involviert (Ono et al., 2003).

## 1.6 Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in entzündlichen Erkrankungen

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, teilt man Chemokinrezeptoren und ihre Liganden in zwei große Gruppen ein. Induzierbare pro-inflammatorische Chemokinrezeptoren, wie z.B. CCR2, die von Leukozyten aufgrund einer Stresssituation, wie z.B. einem Entzündungsgeschehen, transient exprimiert werden und konstitutiv exprimierte Chemokinrezeptoren, die zur normalen Leukozytenwanderung und -zirkulation dienen, wie CCR7 (Sallusto et al., 1999). Eine Vielzahl entzündlicher, insbesondere autoimmuner Erkrankungen beim Menschen ist auf eine lokale Akkumulation von infiltrierenden Leukozyten zurückzuführen, die pro-inflammatorische Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche angereichert tragen.

Bei entzündlichen Nierenerkrankungen konnte eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Expression von Chemokinrezeptoren (CCR2, CCR5, CXCR3) hergestellt werden (Segeer et al., 2000 und 2004). Zudem spielen CCR2 und sein Ligand MCP-1/CCL2 eine dominante Rolle bei entzündlichen Erkrankungen der Eingeweide, wie z.B. Morbus Crohn (Connor et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass es bei verschiedenen Arthritiden zu einer starken lokalen Ansammlung von CCR2- und CCR5-exprimierenden T-Zellen und Monozyten im entzündeten Gelenk kommt (Mack et al., 1999). CXCR3-exprimierende T-Zellen und dessen Liganden spielen bei der Rheumatoiden Arthritis eine wichtige Rolle (Wedderburn et al., 2000; Patel et al., 2001). In Liquor und Hirnläsionen von Multiple Sklerose-Patienten wurde eine Anreicherung von CCR5<sup>+</sup>- und CXCR3<sup>+</sup>-T-Zellen sowie eine erhöhte Expression der Liganden MIP-1 $\alpha$ , IP-10 und MIG nachgewiesen (Balashov et al., 1999). Neben CXCR3 scheinen CCR5 und seine Liganden MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES die zweitwichtigste Bedeutung im Prozess der Transplantatabstoßung zu besitzen. Hancock und Kollegen zeigten 2000, dass die kardiale Transplantatabstoßung bei Mäusen von einer massiven Produktion der drei Liganden sowie der Infiltration von CXCR3-aktivierten T-Zellen begleitet wurde. Zusätzlich bewirkte eine Behandlung mit einem monoklonalen anti-CXCR3-Antikörper eine gesteigerte Überlebensrate des

Spenderorgans. CCR5- und CXCR3-defiziente Mäuse waren deutlich resistenter gegen akute Transplantatabstoßung als Wildtyp-Mäuse.

## 1.7 Rolle und Funktion von CCR2, CCR5 und CXCR3

### 1.7.1 CCR2 und der Ligand MCP-1/CCL2

MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), nach der neuen Nomenklatur CCL2 genannt, wurde zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der Chemokinforschung charakterisiert (Matsushima et al., 1988; Rollins et al., 1989). Studien zu CCL2 ermöglichten einen faszinierenden Einblick in Prozesse, die an der Rekrutierung von entzündungsrelevanten Zellen in das Zentrale Nervensystem (ZNS) oder der Differenzierung von naiven T-Zellen beteiligt waren. Das murine CCL2 wurde zum ersten Mal auf genetischer Ebene als JE 1983 charakterisiert (Cochran et al., 1983). Das humane CCL2 wurde 1989 von drei Forschergruppen beschrieben. Es existieren weitere MCP-Familienmitglieder in beiden Spezies, dem Menschen (CCL8/MCP-2, CCL7/ MCP-3, CCL13/ MCP-4) und der Maus (CCL8, CCL7, CCL12/MCP-5). Diese Proteine weisen eine etwa 70%ige Homologie zu CCL2 auf (van Coillie, 1999). Alle MCPs sind in der Lage, Monozyten zu rekrutieren, darüber hinaus rekrutiert MCP-1/CCL2 außerdem noch T-Lymphozyten, Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen und Mikrogliazellen (Sozzani et al., 1995).

Die Expression von CCL2 kann in einer Vielzahl von Zelltypen induziert werden: Monozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen, vaskuläre Muskelzellen, Fibroblasten und Mesangiumzellen (Hora et al., 1992; Proudfoot et al., 2001; Segerer et al., 2000; Stahl et al., 1993). Gliazellen des zentralen Nervensystems sind z.B. in der Lage, konfrontiert durch einen Minimalstimulus, CCL2 auch in der Abwesenheit eines entzündlichen Infiltrates zu produzieren. Zudem bewirkt nahezu jede Stresssituation die Produktion von CCL2 im Gewebe: Traumata, Infektionen, Hypoxia, oxidativer Stress etc. (Glabinski et al., 1996). Unter pathologischen Bedingungen wurde eine Präsenz von MCP-1/CCL2 in betroffenen Gewebearealen nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass MCP-1/CCL2 in der Rheumatoiden Arthritis (RA) in hohen Mengen im Synovium exprimiert wird (Patterson et al., 2002) und, dass eine erhöhte MCP-1-Expression in einigen renalen Erkrankungen, wie der Glomerulonephritis vorliegt (Prodjosudjadi et al., 1995; Cockwell et al., 1998). MCP-1/CCL2 leitet seine Effekte durch Bindung an den Rezeptor CCR2 weiter. CCR2 existiert aufgrund von Splicing-Vorgängen am C-Terminus in zwei Formen, CCR2a und CCR2b, und bindet zusätzlich noch weitere MCPs.

### 1.7.2 CCR1, CCR5 und RANTES/CCL5

RANTES/CCL5 (*regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*) induziert Leukozytenmigration durch spezifische Rezeptoren, wie CCR1, CCR3 und CCR5, besitzt jedoch die höchste Affinität zu CCR5. Es vermittelt die Signaltransduktion und die pro-inflammatorische Migration von klassisch lymphoiden Zellen, wie T-Zellen und Monozyten, hat aber auch Einfluss auf eine Reihe anderer Zellen, einschließlich Basophilen, Eosinophilen, NKs, DCs und Mastzellen (Schall, 1991). Die Expression von RANTES, die hauptsächlich durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Blutplättchen erfolgt, ist ein Charakteristikum einer Entzündung. Obwohl wenig über die Biologie des murinen RANTES bekannt ist, ist es wahrscheinlich, dass das humane (h) und murine (m) RANTES ähnliche Eigenschaften besitzen. Beide Proteine weisen Homologien in Sequenz und Struktur auf: Sie besitzen 83% Sequenzidentität und hohe Konzentrationen an hRANTES sind in der Lage, direkt Maus-Lymphozyten zu rekrutieren. Die Expression von CCR5 auf aktivierten T-Zellen ist zudem stark mit der Migration gegen RANTES/CCL5 assoziiert, und CCR5 kann *in vitro* durch Stimulierung mit IL-2 verstärkt werden. (Qin et al., 1998).

Die Überproduktion von RANTES wiederum wurde in der Vergangenheit mit einer Anzahl von entzündlichen Erkrankungen und pathologischen Prozessen assoziiert, wie Transplantatabstoßung, Arteriosklerose, Arthritis, Atopische Dermatitis, Asthma, DTH-Reaktionen, Glomerulonephritiden, neuronalen Erkrankungen und einigen bösartigen Tumoren (Appay et al, 2001). Es erlangte zudem große Beachtung als gezeigt wurde, dass es mit zwei weiteren Chemokinen, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ , potente Inhibitoren der HIV-Replikation *in vitro* darstellte. Diese Beobachtung war fundamental für die Identifizierung des Rezeptors dieser Chemokine, CCR5, als der wichtige Korezeptor für den Zelleintritt des primären HIV-Stammes (Cocchi et al., 1995).

Eine beim Menschen natürlich vorkommende Mutation im CCR5-Gen, Delta32-Mutation, die in einen nicht funktionellen Rezeptor resultiert, zeigte einen protektiven Effekt im Hinblick auf die HIV-Infektion, aber auch bei der Transplantatabstoßung (Sheppard et al., 2002; Panzer et al., 2005).

CCR1<sup>+</sup>-Zellen werden durch MIP-1 $\alpha$ /CCL3 und MIP-1 $\beta$ /CCL4 stimuliert und der migratorische Effekt wurde für aktivierte T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), B-Lymphozyten, Dendritische Zellen, Eosinophile und Neutrophile nachgewiesen (Patterson et al., 2002). Die Deletion von CCR1 bei Mäusen führte zu einem Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zytokinen, verursachte jedoch eine verlängerte Überlebensrate des Transplantates in einem Mausmodell (Power, 2003).

### 1.7.3 CXCR3 und die Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11

Die drei natürlichen Liganden von CXCR3, MIG (*monokine induced by IFN- $\gamma$* )/CXCL9, IP-10 (*interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 kDa*)/CXCL10 und I-TAC (*IFN-inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant*)/CXCL11, werden während einer Entzündung durch IFN- $\gamma$  induziert und haben eine potente chemoattraktive Wirkung auf Lymphozyten. Während CXCL9 und CXCL10 der Maus bereits vor einigen Jahren beschrieben wurden (Farber, 1997), wurde das Maus-Homolog zum humanen CXCL11 erst kürzlich geklont (Meyer et al., 2000; Widney et al. 2000). Murines CXCL11 weist eine 63%ige Nukleotidsequenz- und eine 68%ige Aminosäuresequenz-Identität zu seinem humanen Homolog auf. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von reifem murinen und reifem humanen CXCL11 liegt bei 82%. Das unreife murine CXCL11 hat 100 Aminosäuren und eine Molekulargewicht von 11,27kDa. Das Molekulargewicht des reifen Proteins, ohne die 21 Aminosäuren lange Signalsequenz, nach Faltung über zwei Disulfidbrücken beträgt 9,109 kDa (Meyer et al., 2001). Die Homologie von reifem murinen und humanen CXCR3 liegt bei 89%. Daher sind Kreuzreaktionen zwischen murinem und humanem CXCL11 und dessen Rezeptor CXCR3 zu erwarten. Meyer und Kollegen zeigten 2001, dass humanes CXCL11 in der Lage ist, beide, den humanen und murinen CXCR3-Rezeptor zu stimulieren und, dass ebenso murines CXCL11 beide CXCR3-Rezeptoren aktiviert. Die Effektivität von murinem CXCL11 humane T-Lymphozyten zu stimulieren war jedoch um einen Faktor 30 geringer und scheint in der Variation von wenigen Aminosäuren im N-terminalen Bereich von murinem zu humanem CXCL11 begründet zu sein (Meyer et al., 2000).

Den Liganden von CXCR3, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 und I-TAC/CXCL11, konnte in der Vergangenheit eine antagonistische Wirkung gegenüber dem Chemokinrezeptor CCR3 zugewiesen werden. Loetscher et al. zeigten 2001, dass die CXCR3-Liganden mit Eotaxin/CCL11 um dessen Rezeptor CCR3 konkurrieren und die Eotaxin-induzierte Migration und Kalziumantwort inhibieren. Zudem wurde erst kürzlich für I-TAC gezeigt, dass es die RANTES und MIP-1 $\alpha$ -induzierte Migration und Kalziumantwort von Monozyten zu inhibieren vermag. Damit kommt I-TAC/CXCL11 in Zukunft eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung von Th1 versus Th2-Immunantworten zu, indem es CCR3 und CCR5 blockiert (Petkovic et al., 2004). CXCR3 wird hauptsächlich auf der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten exprimiert. Die Bindung von IP-10/CXCL10 und MIG/CXCL9 an CXCR3 scheint wichtig bei der Weiterleitung von spezifischen Signalen für die selektive Einwanderung von aktivierten bzw. Effektor-Zellen zu haben (Sallusto et al., 1998). Zum anderen zeigen neuere Studien die Bedeutung von CXCR3-positiven Lymphozyten in der Pathogenese von entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (Balashov et al., 1999; Simpson et al., 2000), rheumatoider Arthritis (Patel et al., 2001; Ruth et al., 2001; Wedderburn et al., 2000), Psoriasis (Flier et al., 2001; Rottman et al., 2001) und Tuberkulose (Sauty et al., 1999). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass CXCR3 zudem in die Entwicklung einer akuten Transplantatabstoßung involviert ist (Hancock et al., 2000; Segerer et al., 2001). CXCR3 existiert in zwei Splice-Varianten, CXCR3A und

CXCR3B, die sich in der extrazellulären Domäne des Rezeptors unterscheiden, wobei nur PAF-4/CXCL4 (*platelet activating factor 4*) an CXCR3B bindet (Lasagni et al., 2003).

## 1.8 Strategien für die Therapie entzündlicher Erkrankungen

Viele Erkrankungszustände konnten mit einer nicht funktionierenden Regulation des Chemokin-Netzwerkes in Zusammenhang gebracht werden, wie z.B. Rheumatoide Arthritis (RA) (Matsui et al., 2001), Multiple Sklerose (MS) (van der Voorn et al., 1999), Arteriosklerose (Wang et al., 2001), Alzheimer (Streit et al., 2001), Asthma (Stellato et al., 2001), chronische Atemwegserkrankungen (Owen, 2001), allergische Erkrankungen (C. Bandeira-Melo et al., 2001), Transplantatabstoßung und (HIV)-Infektionen (*human immunodeficiency virus*) (Murakami et al., 2000). Es besteht offensichtlich eine Notwendigkeit für die Entwicklung therapeutischer Strategien und Agenzien, um Entzündungen zu kontrollieren und zu verhindern.

Es sind in der Vergangenheit einige molekularbiologische Ansätze und Strategien entwickelt worden, die eine Behandlung von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen, wie Nephritiden, Arthritiden, Multipler Sklerose oder anderen Autoimmunerkrankungen ermöglichen sollen. Dabei ergeben sich verschiedene molekulare Ebenen der Intervention. Bereits auf transkriptioneller Ebene wird versucht, durch Einsatz der siRNA (*small-interfering RNA*) oder TFO (*Triple-Helix-Formig Oligonucleotides*)-Technik (Marchand et al., 2001; Kautz et al., 2005), die übermäßige Generierung wichtiger Chemokine durch den Organismus zu verhindern. Zum anderen wird auf Proteinebene versucht, durch Herstellung spezifischer Antikörper, kleiner nicht-peptidischer Moleküle oder spezifischer Chemokinrezeptor-Antagonisten, die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsort und die darauf folgende Verstärkung der Immunantwort selektiv zu unterbinden.

### 1.8.1 Antikörper gegen Rezeptoren

Die Effekte von Antikörpern wurden in der Vergangenheit *in vitro* als auch in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen *in vivo* untersucht (Horuk et al., 2001). In der Behandlung der rheumatoiden Arthritis wird z.B. ein blockierender TNF- $\alpha$  Antikörper (Infliximab) mit großem Erfolg eingesetzt (Paleolog, 2003; Braun et al., 2003). Auch in der Transplantatabstoßung wird ein monoklonaler Antikörper (mAk) in der Behandlung eingesetzt. Daclizumab und Basiliximab sind beides humane IgG Antikörper, die an die  $\alpha$ -Untereinheit des humanen IL-2 Rezeptors binden und durch die Blockade des Rezeptors die Abstoßung beeinflussen (Waldmann et al., 1998). Der murine monoklonale Antikörper Muromab (OKT3) wird u.a. bei akuter renaler,

hepatischer und kardiologischer Abstoßungsreaktion eingesetzt (Sgro, 1995). Der Einsatz monoklonaler Ak kann allerdings auch unerwünschte Nebenwirkungen haben. So wurden neben einer Überaktivierung des Immunsystems durch eine systemische Zytokinproduktion auch neurologische Komplikationen sowie eine gestörte Koagulation beschrieben (Sgro, 1995).

### 1.8.2 Nicht-peptidische Antagonisten

Mehrere nicht-peptidische, niedermolekulare Antagonisten, die Chemokinrezeptoren, wie CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 und CXCR4 spezifisch blockieren sollen, wurden in den letzten Jahren entwickelt (Hesselgesser et al., 1998, Horuk et al., 2001; Gao et al., 2003). Nur wenige davon haben es bis zum Einsatz in klinischen Studien geschafft (zusammengefasst von Onuffer et al., 2002). Kreuzreaktionen mit anderen wichtigen Rezeptoren und schwere Nebenwirkungen limitieren die Zahl der einsetzbaren Antagonisten.

### 1.8.3 Virale Proteine

Eine weitere wichtige Gruppe von natürlich vorkommenden Chemokinrezeptor-Antagonisten sind virale Proteine. Das Kaposi's Sarkom ist eine häufige Krebserkrankung, die bei Menschen mit erworbener Immunschwäche (AIDS) auftritt. Das Genom des Kaposi's Sarkom-assoziierten Herpesvirus-8 (KSHV/HHV-8) kodiert offene Leserahmen für drei funktionelle Chemokin-Analoga, genannt virales Makrophagen inhibitorisches Protein (vMIP-)-I, II und III (Boshoff et al., 1997). Während nachgewiesen wurde, dass vMIP-I und MIP-III spezifisch an die Rezeptoren CCR4 und CCR8 binden, wurde für vMIP-II eine Bindung an verschiedene CC- und CXC-Chemokinrezeptoren beobachtet (Kledal et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass vMIP-II die humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CCR1, CCR2b, CCR3, CCR5, CCR8, CXCR4, XCR1 und CX3R1 bindet und wird daher auch als Breitband-Antagonist bezeichnet. Neben der antagonistischen Wirkung auf CCR1, CCR2b, CCR5 und CXCR4, hat vMIP-II jedoch auch agonistische Aktivität für CCR3. Für die Bindung an CCR8 existieren kontroverse Studien (Kledal et al., 1997; Chen et al., 1998; Dairaghi et al., 1999). Daraus folgend könnte virales MIP-II zur Verschiebung von der Th1-vermittelten zur Th2-vermittelten Immunantwort beitragen.

Virales MIP-II erlangte durch die Antagonisierung der beiden HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 große Aufmerksamkeit, und es konnte gezeigt werden, dass vMIP-II die HIV-Infektion *in vitro* inhibiert (Kledal et al., 1997; Boshoff et al., 1997). Die strukturellen Unterschiede, die vMIP-II die Bindung von CC- und CXC-Rezeptoren ermöglicht, scheint in einzelnen Aminosäuren des N-terminalen *loops* begründet. Massenspektrometrische Untersuchungen zur Struktur von vMIP-II ergaben, dass synthetisch hergestelltes vMIP-II bei millimolaren Konzentrationen in Lösung als Monomer vorliegt (Liwang et al., 1999). Gegensätzlich dazu zeigte die Kristallisierung des Proteins eine für viele Chemokine typische Dimerformation (Fernandez et al., 2000).

Im *in vivo*-Modell der anti-GBM Glomerulonephritis (*anti-glomerular basement membrane antibody-induced experimental glomerulonephritis*) in Ratten inhibierte der Einsatz von vMIP-II die MCP-1-, RANTES- und Fraktalkin-induzierte Migration von aktivierten Leukozyten, reduzierte die Infiltration von Leukozyten in die Glomeruli und verminderte zudem die Proteinurie (Chen et al., 1998). In anderen Studien war vMIP-II in der Lage, die zelluläre Infiltration nach einer Rückenmarksverletzung in Ratten zu minimieren (Ghirnikar et al., 2000), es reduzierte die entzündlichen Symptome einer Ischämie (Durchblutungsstörung) im Gehirn bei Mäusen (Takami et al., 2001) und die Abstoßungsreaktion nach Herztransplantationen (Holzknecht et al., 2000).

#### 1.8.4 N-terminal modifizierte Chemokine als Antagonisten

Ein viel versprechender therapeutischer Ansatzpunkt ist die Ebene der Chemokinrezeptoren, da sie ein chemisch verfügbares Angriffsziel sind, welches sich als wichtige Schnittstelle zwischen multiplen Chemokinen und multiplen Signalwegen darstellt. Die Expression von Chemokinrezeptoren auf einer Immunzelle hängt von verschiedenen Faktoren, wie Stimulations- und Differenzierungszustand der Zelle und Zelltyp-Spezifität, ab. Das bedeutet, dass Chemokine und ihre Rezeptoren spezifischen Zelltypen, immunologischen Funktionen und auch anatomisch/physiologischen Kompartimenten zugeordnet sind, wodurch die Chemokinrezeptor-Antagonisierung als ein viel versprechendes Werkzeug erscheint, um selektive Immunregulation zu ermöglichen.

Die Tatsache, dass die N-terminale Region der Chemokine überaus wichtig ist, wurde von verschiedenen Forschergruppen durch Verwendung von Verlängerungen und Deletionen dieser Region in den frühen 90ern entdeckt. 1994 und 1995 wurde von Zhang et al. und Gong et al. gezeigt, dass eine synthetisch hergestellte N-terminale Deletionsmutante des humanen MCP-1/CCL2, MCP-1(9-76) genannt, ein potenter Inhibitor der MCP-1-stimulierten Migration von THP-Zellen als auch von Monozyten ist. Die Gruppe konnte zeigen, dass eine tägliche Injektion von MCP-1(9-76) in MRL/lpr-Mäuse (Mausmodell eines beschleunigten Systemischen Lupus Erythematosus, SLE) den Beginn der Arthritis, dokumentiert durch Messung der Gelenkschwellung und durch histopathologische Untersuchungen der Gelenke, verhinderte (Gong et al., 1997). Die Verlängerung des rekombinanten humanen RANTES durch Erhaltung des initialen Methionins, Met-RANTES, inhibierte in konzentrationsabhängiger Weise die RANTES-, MCP-3- und Eotaxin-induzierte Mobilisierung intrazellulären Kalziums in Eosinophilen, was Met-RANTES als potenten Antagonisten für CCR1 und CCR3 bestätigte (Elsner et al., 1997). Ein weiterer generierter Chemokinantagonist, Aminooxypentan- (AOP)-RANTES, wirkte positiv gegen die Monozyten- und Makrophageninfiltration und verbesserte den renalen Entzündungszustand in einer experimentellen Glomerulonephritis (Panzer et al., 1999).

Ein weiterer viel versprechender Chemokinrezeptor-Antagonist wurde mit I-TAC(1-3)del generiert. Dieser Antagonist für CXCR3 wurde von dem murinen I-TAC/CXCL11 (*interferon-*

*inducible T cell- $\alpha$  chemoattractant*) durch Deletion der ersten drei N-terminalen Aminosäuren hergestellt. Von Clark-Lewis et al. wurde 2003 gezeigt, dass das humane N-terminal deletierte I-TAC-Analog, I-TAC(4-73), ein potenter Antagonist für den CXCR3-Rezeptor ist. Der Antagonist war in der Lage, mit markiertem I-TAC um den Rezeptor CXCR3 zu konkurrieren, und die Liganden-induzierte Chemotaxis und Kalziumantwort CXCR3-positiver Zellen zu inhibieren. Es wurde gezeigt, dass I-TAC gegenüber den zwei anderen natürlichen Liganden von CXCR3, MIG und IP-10, die höchste Affinität zu seinem Rezeptor aufweist. Zudem konnte bei den beiden anderen CXCR3-Liganden MIG und IP-10 durch N-terminale Modifikation kein Antagonist erhalten werden. Daher wurde I-TAC als möglicher Antagonist gewählt.

## 1.9 Zielsetzung

Es ist bekannt, dass Chemokine und ihre Rezeptoren bei entzündlichen Erkrankungen für die Infiltration von Immunzellen am Entzündungsort verantwortlich sind und damit auch eine essentielle Rolle bei der Chronifizierung von Erkrankungen einnehmen (Baggiolini et al., 1997). Eine viel versprechende therapeutische Strategie, diese Infiltration von hauptsächlich T-Lymphozyten im Gewebe zu unterbinden, ist die spezifische Chemokinrezeptor-Blockade mit Hilfe von Antagonisten.

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die drei Chemokinrezeptor-Antagonisten MCP-1(1-8)del, virales MIP-II (in Vorarbeit an der MH Hannover kloniert) und I-TAC(1-3)del in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* zu exprimieren, in größeren Mengen sauber aufzureinigen und sie anschließend in einem Zellmodell *in vitro* zu charakterisieren.

Chronisch-entzündliche Erkrankungen, wie Psoriasis, Rheumatoide Arthritis (RA), Multiple Sklerose, Nephritis etc. sind im Unterschied zu akuten Entzündungen durch mononukleäre Infiltrate, d.h. Monozyten und Lymphozyten, gekennzeichnet. Speziell die o.g. Erkrankungen sind zudem durch eine Th1-getriebene Immunpathogenese charakterisiert. Als Modellzelle sollte daher der T-Helfer-1 Lymphozytenklon, IF12, hinsichtlich seines Chemokinrezeptorprofils analysiert und als Modellzelle zur Untersuchung der Chemokinrezeptor-Antagonisten verwendet werden. Da dieser antigenspezifische Th1-Klon allein in der Lage war, eine Nephritis in einem SCID-Mausmodell zu induzieren (Radeke et al., 2002), war die pathogenetische Relevanz gegeben.

Da verschiedenen Zelltypen je nach Stimulierungs- und Differenzierungszustand verschiedene Chemokinrezeptoren exprimieren (Sallusto et al., 1998), war es wichtig zu wissen, welche Chemokinrezeptoren der Th1IF12-Zellklon unstimuliert und nach Stimulierung auf der Oberfläche trägt. Über RT-PCR-Analysen und cDNA-Arrays sollte das Rezeptorprofil auf RNA- und Proteinebene ermittelt werden.

Anschließend sollte die antagonistische Wirkung der generierten Chemokinrezeptor-Antagonisten auf den Th1F12-Zellkon mit Hilfe von funktionellen Tests untersucht und die Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktionen näher beleuchtet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von RNA

Gesamt-RNA proliferierender Zellen wurde durch Verwendung des RNA-Clean Kits (Hybaid, Ulm) oder mit Hilfe des TRIZOL-Reagenz (GIBCO) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen, 1:100 und 1:1000 verdünnt und die Extinktion bzw. optische Dichte (OD) in einem Spektral-Photometer (GeneQuant *Pro* Calculator, Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm gegen reines H<sub>2</sub>O bestimmt. Das Verhältnis OD<sub>260/280nm</sub> stellt dabei ein Kriterium für die Reinheit einer Probe dar, wobei Werte von 1,8-2,0 nahezu reinen Nukleinsäurelösungen entsprechen. Geringere Werte weisen auf eine Kontamination mit Protein oder Phenol hin. Für eine längere Aufbewahrung wurde RNA bei -80°C in 70%igem Ethanol eingefroren.

#### 2.1.2 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Isolierung von DNA aus *P. pastoris*, z.B. zum Nachweis des Phänotyps, erfolgte durch Inkubation der intakten Zellen in TSE/Proteinase K/SDS-Puffer bei 37°C für 60 Minuten. Nach Zugabe eines Volumens Phenol/Chloroform (1:1) wurde die Suspension bei 3000x g für 15 Minuten zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Optional wurde der Phenol/Chloroform-Schritt wiederholt. Anschließend wurden der Suspension 1/10 Volumen 7M NaAc-Lösung und 2 Volumen 100%iger Ethanol zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10.000x g für 20 Minuten und die Trocknung des Pellets an der Luft. Die DNA wurde in sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen, 1:100 und 1:1000 verdünnt und die Extinktion bzw. OD in einem Spektral-Photometer (GeneQuant *Pro* Calculator, Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 260nm gegen reines H<sub>2</sub>O bestimmt.

Tabelle 2-1: Material für DNA-Isolierung

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| TSE-Puffer                    | 10mM Tris<br>10mM EDTA<br>150mM NaCl<br>0,4% SDS |
| Proteinase K                  | 200µg/ml   |
| Ethanol                       | 100%   |
| Natriumacetat-Puffer (pH 7,5) | 7M NaAc  |

### 2.1.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können durch Alkohole in Anwesenheit hoher Konzentrationen monovalenter Kationen gefällt werden. Dabei verbleiben niedermolekulare Verbindungen wie Aminosäuren und Nukleotide in Lösung.

Der wässrigen Lösung von RNA oder DNA wurden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen eiskalter 100%iger Ethanol zugegeben. Nach kräftigem Schütteln (Vortex), einer 20-minütigen Inkubation bei -20°C und anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 14.000rpm und 4°C, erhielt man ein winziges Pellet aus Nukleinsäuren und Acetat-Salz am Boden des Reaktionsgefäßes. Dieses Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen, und schließlich kurz an der Luft getrocknet. Zur weiteren Verwendung wurde das Pellet in wässrigem Puffer (EB Puffer oder H<sub>2</sub>O) aufgenommen.

Tabelle 2-2: Material für die Ethanolfällung

|   |   |
|---|---|
| TRIZOL Reagenz  | Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe |
| DEPC, 0,1% (v/v) DEPC in Millipore H <sub>2</sub> O, steril | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München      |
| Ethanol 75%, 100%   | Apotheke, J.W. Goethe-Universität       |
| Chloroform  | Apotheke, J.W. Goethe-Universität       |

### 2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) (Mullis & Faloona, 1987, Saiki *et al.*, 1985) ist eine *in vitro*-Anwendung zur selektiven, enzymatischen Amplifizierung einer DNA-Sequenz mit Hilfe einer temperaturstabilen DNA-Polymerase (z.B. *taq*, *pxf*). Sie ist eine Abfolge aus 25-35 Zyklen, bei denen sich drei Phasen aneinander reihen: das Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung (Annealing) sequenzspezifischer Oligonukleotide mit einem freien 3'-OH-Ende (Primer) an die Ausgangs-DNA (Template, Matrix) und Synthese des komplementären Strangs (Elongation). Damit wird das Ausgangsprodukt theoretisch exponentiell vervielfältigt. Die Einsatzmöglichkeiten der PCR-Technologie sind sehr variabel und reichen von quantitativen und qualitativen Nachweismethoden über Mutagenese-, Markierungsreaktionen (z.B. <sup>32</sup>P oder Digoxigenin) bis hin zu Subklonierungen.

#### **Standard-PCR**

Im Allgemeinen wurde die PCR in einem Gesamtvolumen von 100µl durchgeführt, mit einer finalen Konzentration an 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5µM eines jeden Primers, 1x PCR Puffer und der Platinum *Taq* Polymerase für die Amplifikation (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe). Die PCR wurde über 30 Zyklen (94°C 3min, 94°C 45s, 55°C 30s, 72°C 90s) mit einer finalen Verlängerung von 10 Minuten bei 72°C mittels eines PCR-Cyclers von Biometra (*DNA thermal cycler*) durchgeführt.

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <u>Taq-PCR (100µl):</u> | 10µl 10x Reaktionspuffer (-MgCl <sub>2</sub> ),<br>2µl dNTPs (10mM),<br>3µl MgCl <sub>2</sub> (50nM),<br>5µl <i>Primer</i> (fw) (10µM),<br>5µl <i>Primer</i> (rev) (10µM),<br>100-300ng DNA <i>Template</i> ,<br>x µl H <sub>2</sub> O,<br>0,5µl Platinum <i>Taq</i> Polymerase (5U/µl) |
|-------------------------|---|

Das folgende PCR-Protokoll wurde für die Analyse von *E.coli*- oder *Pichia*-Klonen durchgeführt, um die Integration der gewünschten Insert-cDNA in die Organismus-DNA nachzuweisen. Die PCR wurde über 34 Zyklen (94°C 2min, 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min) mit einer finalen Verlängerung von 72°C über 1min durchgeführt.

|  |  |
|--|--|
| <u>Taq-PCR zur Integration (10µl):</u> | 1µl 10x Reaktionspuffer,<br>0,5µl dNTPs (10mM),<br>0,6µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM),<br>0,5µl 5' <i>AOX1</i> Primer (10pmol/µl),<br>0,5µl 3' <i>AOX1</i> Primer (10pmol/µl),<br>1,8µl H <sub>2</sub> O,<br>0,1µl Platinum <i>Taq</i> Polymerase (5U/µl) |
|--|--|

Die Platinum *Pfx*-Polymerase besitzt im Gegensatz zur herkömmlichen *Taq*-Polymerase eine 3→5' Exonukleaseaktivität (sogenannte Korrekturlesefähigkeit), wodurch die Fehlerhäufigkeit mit nur 1,3x 10<sup>-6</sup> pro Nukleotid etwa sechsmal geringer ist. Dadurch wird die eingesetzte DNA wesentlich fehlerfreier vervielfältigt und bei der Untersuchung unbekannter Sequenzen wird so bei der Klonierung das Risiko von PCR-Artefakten verringert. Aufgrund einer spezifischen Antikörperbindung wird die *Pfx*-Polymerase in einer inaktiven Form geliefert und erfordert einen automatischen *hot start*, eine kurze Temperaturperiode bei 94°C, für die Initiation der PCR.

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <u><i>Pfx</i>-PCR (50µl)</u> | 5µl 10x Reaktionspuffer,<br>1,5µl dNTPs (10mM),<br>1µl MgSO <sub>4</sub> (50mM),<br>1,5µl <i>Primer</i> (fw) (10µM),<br>1,5µl <i>Primer</i> (rev) (10µM),<br>100-300ng DNA <i>Template</i> ,<br>x µl H <sub>2</sub> O,<br>0,5µl Platinum <i>Pfx</i> DNA Polymerase (2.5U/µl) |
|------------------------------|--|

Das Programm zur Durchführung der *Pfx*-PCR enthielt folgende Schritte: 94°C 2min (Denaturierung), 25 Zyklen (94°C 15s, 55°C 30s, 68°C 1min), 68°C 10min, 4°C.

**Reverse Transkriptase (RT-)PCR**

Die Reverse-Transkriptase PCR dient zur Amplifikation von RNA-Templates. Es wird der Standard-PCR ein Reaktionsschritt vorgeschaltet, bei dem die RNA-Templates durch eine Reverse-Transkriptase, wie z.B. MuLV-RT, aus dem Murine Leukämie-Virus isoliert, in cDNA (copy-DNA) umgeschrieben werden. Der in der PCR eingesetzte Reverse-Primer dient der RT dabei als Startpunkt zur Synthese des cDNA-Strangs.

In dieser Arbeit wurde die RT-PCR in erster Linie zum Nachweis der Chemokinrezeptor-Expression von Immunzellen auf RNA-Ebene mit den in Tabelle02 aufgelisteten Oligonukleotiden verwendet. Die Erststrangsynthese wurde mit einem RT-PCR Kit namens ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurden 2µg isolierte Gesamt-RNA verwendet.

|                        |  |
|------------------------|--|
| <u>RNA Primer-Mix:</u> | 1-2µg RNA,<br>1µl Oligo (dT) <sub>n</sub> ,<br>1µl Random Hexamers,<br>Add 10µl H <sub>2</sub> O |
|------------------------|--|

Der RNA Primer-Mix wurde für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, gefolgt von einer Pause bei 4°C. Im Anschluss an die Denaturierung wurden 10µl des RT-Mastermix (RT-MM) zum RNA Primer-Mix zugegeben, gemischt und folgende Zyklen durchgeführt: 25°C 10min, 50°C 45min, 85°C 5min. Optional wurden 1µl RnaseH (2U/µl) für 20 Minuten bei 37°C zugegeben.

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <u>RT-Master-Mix (RT-MM):</u> | 4µl 5x cDNA Synthesepuffer,<br>1µl 0,1M DTT,<br>1µl H <sub>2</sub> O,<br>2µl 10mM dNTP-Mix,<br>1µl Rnase Out (40U/µl),<br>1µl ThermoScript RT (15U/µl) |
|-------------------------------|--|

Nachdem die RNA revers transkribiert wurde, fand eine Amplifikation der synthetisierten cDNA durch eine sich anschließende PCR mit folgenden Zyklen statt: 94°C 2min, 34 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C 30s und 72°C 1min.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <u>PCR-Master-Mix (50µl):</u> | 5µl 10x Reaktionspuffer (-MgCl <sub>2</sub> ),<br>1µl dNTPs (10mM),<br>1,5µl MgCl <sub>2</sub> (50mM),<br>1µl <i>Primer</i> (fw) (10µM),<br>1µl <i>Primer</i> (rev) (10µM),<br>2µl cDNA (RT),<br>38µl H <sub>2</sub> O,<br>0,5µl Platinum <i>Taq</i> Polymerase (5U/µl) |
|-------------------------------|---|

Tabelle 2-3: Oligonukleotide

| Name        | Sequenz (5'-3')   |
|-------------|---|
| mCCR1_fw    | GGCCCTAGCCATCTTAGCTT                                    |
| mCCR1_rev   | AGGCAATCACCTCAGTCACC                                    |
| mCCR2_fw    | GCATATAGCGCTAAGCTTGCCACCATGGAAGACAATAATATGTTAC<br>CT    |
| mCCR2_rev   | ATGTCGACCTCGAGTTTACTGCAGCAACCCAACCGAGACCTCTTGC<br>TC    |
| mCCR3_fw    | GCATATGAATTCGCTAGCGCCACCATGTACCTTGAGGTTAGTGAAC<br>GT    |
| mCCR3_rev   | ATGTCGACCTCGAGTTTAGGATCCCAAGCCCAGGTAGGAGGCCTC<br>AGT    |
| mCCR5_fw    | TCTGGGCTCACTATGCTGC                                     |
| mCCR5_rev   | GCATAGATGACAGGGTTTAGGC                                  |
| mCCR6_fw    | CTGTTGAACATGGCCATCAC                                    |
| mCCR6_rev   | AGGAGGACCATGTTGTGAGG                                    |
| mCCR7_fw    | GCATATGAATTCGATATCGCCACCATGGACCCAGGGAAACCCAGG<br>AAA    |
| mCCR7_rev   | ATGTCGACCTCGAGTCTAGGATCCCGGGGAGAAGGTTGTGGTGGT<br>CTC    |
| mCXCR3_fw   | GCATATGATTCGCTAGCGCCACCATGTACCTTGAGGTTAGTGAACG<br>T     |
| mCXCR3_rev  | ATGTCGACCTCGAGTTTAGGATCCCAAGCCCAGGTAGGAGGCCTC<br>AGT    |
| Tubulin_fw  | TTCCCTGGCCAGCT(GC)AA(AGCT)GC(AGCT)GACCT(AGCT)CGCAA<br>G |
| Tubulin_rev | CATGCCCTCGCC(AGCT)GTGTACCAGTG(AGCT)A(AGCT)GAAGGC        |

### 2.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

PCR-Produkte werden durch Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden DNA-Fragmente durch die Maschen-Struktur des Agarosegels nach ihrer Größe und Form aufgetrennt und können durch Ethidiumbromid, welches in den Doppelstrang interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren mit einer Größe von 50 Basenpaaren (bp) bis zu mehreren Kilobasen (kb) erfolgt im Allgemeinen in einem 1-1,5%igen Agarosegel. In der vorliegenden Arbeit wurde eine horizontale Gelelektrophorese mit dem *Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System* der Firma Bio-Rad durchgeführt. Für eine gewünschte



markiert. Für diesen Schritt wurde zusätzlich MMLV Reverse Transkriptase (200U/μl, Promega) und rRNasin (Rnase Inhibitor, 40U/μl, Promega) verwendet.

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <u>Markierungsreaktion (20μl):</u> | 8μl 5x Markierungspuffer B               |
|                                    | 5μl (α- <sup>32</sup> P)-dCTP (10mCi/ml) |
|                                    | Rnase Inhibitor (40U/μl)                 |
|                                    | MMLV Reverse Transkriptase (50U/μl)      |
|                                    | H <sub>2</sub> O, Rnase-frei             |

In einem zweiten Schritt wurde der Markierungsansatz für 2 Minuten auf 42°C vorgeheizt, 20μl des Ansatzes jedem Reaktionsansatz zugefügt, gemischt und für 25 Minuten bei 42°C inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 5μl 10x Stopplösung (Puffer C). Bevor die markierte Sonde der revers transkribierten cDNA zugegeben werden konnte, musste diese denaturiert werden. Dazu wurde die markierte cDNA mit 5μl Denaturierungslösung (Puffer D) versetzt und für 20 Minuten bei 68°C inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 50μl vorgewärmter Neutralisierungslösung (Puffer E) gestoppt und die Inkubation für weitere 10 Minuten fortgesetzt.

*Hybridisierung und Detektion.* Um den Hybridisierungsprozess zu starten, wurden 15ml der Hybridisierungslösung (*GEArray Hybridization solution*) auf 68°C vorgewärmt und mit 150μl hitzedenaturierter Lachssperma-DNA (*Invitrogen Life Technologies*, Karlsruhe, 10μg/μl) versetzt. Die GEArray-Membranen wurden mit je 5ml der DNA-Hybridisierungslösung in Hybridisierungsröhren überführt und für 2 Stunden im Hybridisierungsofen (*Kendro, Laboratory products*) bei 68°C vorinkubiert. Im Anschluss daran wurde die Vorhybridisierungslösung durch die mit Sonden-cDNA versetzte Lösung ersetzt und über Nacht unter gleichmäßigem Rotieren bei 68°C inkubiert.

Für die Stringenzwaschungen wurden die Membranen mit Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1% SDS) versetzt und zweimal für 20 Minuten bei 68°C im Hybridisierungsofen rotiert. Lösung 1 wurde durch Waschlösung 2 (0,1x SSC, 0,5% SDS) ersetzt und wiederum zweimal für 20 Minuten bei 68°C inkubiert. Die mit <sup>32</sup>P-markierten Membranen wurden feucht in Frischhaltefolie eingepackt, in einer Fotokassette (*Raytest GmbH, Straubenhardt*) über Nacht einer Phosphoimagerplatte (*BAS-MS 2040, FUJI Photo Film Co., LTD, Japan*) ausgesetzt und durch einen Phosphoimager (*BASReader-1500, Fuji Photo Film C., Tokyo, Japan*) automatisch eingelesen. Die densitometrische Auswertung der Imagerplatte erfolgte mittels zugehöriger Software (*BAS-Reader Software, Version 2.13d* und *TINA-Software, Version 2.09g*). Die Signale wurden gegen das Haushaltsgen Aktin (Positivkontrolle) standardisiert, dessen Wert als 100% angegeben wurde. Als Negativkontrolle diente der Hintergrund der pUC18 cDNA; dieser Wert wurde zudem von allen anderen Signalen abgezogen.

*Strippen der Membranen.* Zur Wiederverwendung der Membranen wurden diese in 200ml kochende 0,5% SDS Lösung gelegt und für 10 Minuten gekocht. Anschließend wurden sie in 2x SSC Lösung überführt und langsam abgekühlt. Die Aufbewahrung erfolgte eingeschweißt in 2x SSC Lösung bei 4°C.

### 2.1.7 cDNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle der Nukleotidsequenz der generierten Antagonisten wurde jeweils eine DNA-Sequenzierung mittels der basenspezifischen Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Dabei erfolgt die enzymatische Elongation eines an einzelsträngige DNA gebundenen Oligonukleotidprimers bis zum zufälligen Einbau eines fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotids, der zur Termination der DNA-Polymerase-katalysierten Reaktion und damit zum Kettenabbruch führt, da wegen der fehlenden 3'-Hydroxylgruppen eine Fortsetzung der DNA-Synthese an einmal eingebauten 2',3'-Didesoxynukleosid-Resten nicht möglich ist. Für die Sequenzierreaktion wurde der Big Dye Terminator DNA Sequencing Kit von Perkin Elmer verwendet.

Es wurden 4µl *Premix* zu 10-100ng DNA template und 3-10pmol Primer (eine Richtung!) zugegeben. Nach Auffüllen des Ansatzes auf 10µl mit H<sub>2</sub>O wurden folgende PCR-Zyklen durchgeführt: 96°C 10s, 50°C 5s, 60°C 2min (25 Zyklen). Die PCR Proben wurden anschließend mittels Ethanol-fällung gereinigt, mit 25µl TSR Reagenz (*template suppression reagent*) versetzt und für 2 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden in spezielle Sequenziergefäße pipettiert und die Sequenzierung in einem ABI PRISM™ Sequenziergerät 310 (Perkin Elmer) durchgeführt. Der Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der publizierten Sequenz erfolgte durch eine im Internet zur Verfügung stehende Software: (BLAST) der NLM Pubmed® Homepage ([www.pubmed.de](http://www.pubmed.de)).

### 2.1.8 Aminosäure-Sequenzierung

Als Edman-Abbau, benannt nach dem schwedischen Biochemiker Pehr Edman (1914 bis 1977) bezeichnet man die Methode zur Sequenzierung der Aminosäurefolge am N-Terminus von Proteinen. Der Edman-Abbau beruht auf der Reaktion der Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure einer Peptidkette mit Phenylisothiocyanat. Nach der Fragmentierung eines Proteins in Peptide wird so die endständige Aminosäure von der Kette abgespalten und kann in weiteren Reaktionsschritten nachgewiesen werden. Durch die Wiederholung der Reaktion wird schließlich das nachzuweisende Protein in seine Aminosäurebestandteile abgebaut und sequenziert.

Die Aminosäure-Sequenzierung der hergestellten Muteine wurde freundlicherweise von Dr. H. Heid (Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg) durchgeführt. Dazu

wurden 2-5µg der zu sequenzierenden Muteinprobe gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe Western Blot). Für die Sequenzierung wurde die Membran angefärbt, die zu sequenzierende Bande ausgeschnitten, das Protein von der Membran abgelöst und weiter verarbeitet.

## 2.2 Biochemische und Proteinchemische Methoden

### 2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung von Proteinfractionen unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer. Die Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Sammelgel (4%ig) fokussiert und über ein Polyacrylamid-Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine können verschiedene Gelkonzentrationen (üblicherweise zwischen 10% und 15%) gewählt werden. Zusätzlich bewirkt die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Detergens, welches den größten Teil der nicht kovalenten Bindungen aufbricht, so die Proteine denaturiert und sich Proteinen in einem konstanten Verhältnis zu deren Masse anlagert, eine negative Ladung der Proteine, die proportional zu ihrer Masse ist. Monoacrylamid und Methylenbisacrylamid polymerisieren unter dem Einfluss von TEMED und Ammoniumpersulfat zu einem Netzwerk, in dem kleinere Proteine leichter beweglich sind als große.

Proteinproben wurden mit 2-fach Laemmli-Puffer versetzt und 2-3 Minuten bei 95°C denaturiert. In der vorliegenden Arbeit wurden 12,5% oder 15% SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem Mini-Preotean III System der Firma Bio-Rad in Tris-Glycin Puffer bei 60mA bis zur gewünschten Auftrennung. Ein Multimark Standard (*Invitrogen Life Technologies*, Karlsruhe) diente als Größenmarker.

**Laemmli-Puffer:** 3,8ml H<sub>2</sub>O,  
1ml 0,5M Tris, pH 6,8,  
0,8ml Glyzerin,  
1,6ml 10% SDS,  
0,4ml β-ME,  
0,4ml 0,05% Bromphenolblau

**Tris-Glycin-Puffer:** 12ml 2M Tris,  
92ml 2M Glycin,  
9,6ml 10% SDS,  
add 1l H<sub>2</sub>O, pH 8,8

Tabelle 2-5: Material zum Gießen von einem SDS-Gel

| (ml)              | Trenngel 12,5% | Trenngel 15% | Sammelgel 4% |
|-------------------|----------------|--------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O  | 1,66           | 1,1          | 2,1          |
| 30% Acrylamid     | 2,08           | 2,5          | 0,5          |
| 1,5M Tris, pH 8,8 | 1,35           | 1,3          |              |
| 1,5M Tris, pH 6,8 |                |              | 0,38         |
| 10% SDS           | 0,05           | 0,05         | 0,03         |
| 10% APS           | 0,05           | 0,05         | 0,03         |
| TEMED             | 0,002          | 0,002        | 0,003        |

Die Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinproben erfolgte mittels Western Blot Analyse und anschließender Silberfärbung der geblotteten SDS-Gele (2.2.2).

### 2.2.2 Silberfärbung von Proteingelen

Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteine wurde die Silberfärbung verwendet. Das Gel wurde dazu im Anschluss an den Blotvorgang 20-30 Minuten auf einem Schüttler in Fixierlösung inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Gel eine Stunde in Wasser gespült, um die Fixierlösung zu entfernen. Danach erfolgte eine 1-2 minütige Inkubation des Gels in 0,02% Natriumthiosulfat-Lösung mit anschließendem zweimaligen Wässern für eine Minute. Für die Färbung inkubierte man das Gel 30 Minuten in Silbernitratlösung. Das Gel wurde nochmals zweimal für eine Minute in Wasser geschwenkt und durch Inkubation in Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität entwickelt. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 0,1% Essigsäure gestoppt, das Gel in Wasser wieder entsäuert, für den Trocknungsprozess nicht mehr als 15 Minuten in DryEasy-Lösung inkubiert und nach Herstellerprotokoll getrocknet (*DryEasy Mini-Gel Drying system, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe*).

Tabelle 2-6: Material für die Silberfärbung

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Fixierlösung:             | 112,5ml Methanol,<br>12,5ml Essigsäure,<br>125ml H <sub>2</sub> O                       |
| Natriumthiosulfat-Lösung: | 0,1g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ,<br>add 0,5L H <sub>2</sub> O       |
| Silbernitratlösung:       | 0,5g AgNO <sub>3</sub> ,<br>add 0,5L H <sub>2</sub> O                                   |
| Entwickler:               | 12,5g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ,<br>150µl Formalin,<br>add 0,5L H <sub>2</sub> O |
| Stopplösung:              | 5ml Essigsäure,<br>add 0,5L H <sub>2</sub> O  |

### 2.2.3 N-Glykosidase-F-Verdau

Das Enzym Peptid-N-Glykosidase-F (PNGaseF, Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) wurde erstmals von Plummer et al. 1984 aus dem Kulturfiltrat von *Flavobacterium meningosepticum* isoliert. N-Glykosidase-F spaltet alle Typen Asparagin-gebundener N-Glykanketten, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen.

Der Glykosidase-F-Verdau wurde in dieser Arbeit verwendet, um mögliche N-Glykosylierungen der *Pichia*-generierten Muteine zu erkennen und, um mögliche vom exakten Molekulargewicht abweichende Banden im Western Blot zu analysieren. Dazu wurden etwa 20µg Mutein zuvor in 10%igem SDS (final 1%) bei 100°C denaturiert, in 20mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) aufgenommen und mit 0,5% Nonidet P-40 (Detergenz) und 2U PNGaseF versetzt. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 37°C. Der Ansatz wurde anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse untersucht (Kapitel 2.2.1 und 2.4.2).

### 2.2.4 Heparin-Affinitätschromatographie mittels FPLC

Die FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ist eine klassische Anwendung zur Aufreinigung großer Mengen von verschiedensten Biomolekülen, z.B. Protein oder DNA. Dabei ermöglicht ein Pumpensystem die unabhängige Auftragung von Probe und Puffern auf eine Chromatographie-Säule mit bestimmten Eigenschaften sowie anschließende Waschstschritte und die Elution der Probe mit der Möglichkeit zur Fraktionierung.

Es existieren verschiedene Arten der Chromatographie (z.B. Ionenaustausch-Chromatographie, Affinitätschromatographie etc.), die je nach Eigenschaften des zu reinigenden Proteins eingesetzt werden. Die Affinitätschromatographie (auch biospezifische Adsorption genannt) bezeichnet die Methode zur erfolgreichen Abtrennung eines gewünschten Proteins durch Bindung eines biospezifischen Liganden, welcher kovalent an das Säulenmaterial (Matrix) gekoppelt wird. Nach dem Auftragen des Proteingemisches auf die Affinitätssäule werden die nicht spezifisch an den Liganden bindenden Proteine vollständig gewaschen. Anschließend erfolgt die Elution des gebundenen Proteins mit Hilfe eines geeigneten Puffers. In dieser Arbeit wurde die Affinitätschromatographie mittels Heparinsäule für die Reinigung der in den *Pichia*-Überstand sekretierten Muteine durchgeführt.

Die meisten Chemokine weisen einen sehr hohen isoelektrischen Punkt (pI) auf, der zwischen 9-11 liegt, und binden für gewöhnlich an Glukosaminoglykane der extrazellulären Matrix, wodurch sie einen Chemokingradienten aufbauen. Dabei weisen die verschiedenen Chemokine verschiedene Affinitäten zu Heparin-ähnlichen Molekülen auf. Neben der

Eigenschaft von Heparin als Affinitätspartner zu fungieren, ist Heparin auch in der Lage, bei geeignetem pH-Wert als Kationenaustauscher zu dienen. Dafür sollte der pH-Wert des Puffers mindestens zwei Werte unter dem  $pI$  des zu isolierenden Chemokins liegen.

*FPLC-Lauf von MCP-1(1-8)del und vMIP-II.* Für die Heparin-Affinitätschromatographie wurden 16/19 Heparin HiTrap-Säulen der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) verwendet, sowie die FPLC-Anlage mit zugehöriger Software der Firma Bio-Rad. Nach Entfernen des Konservierungsmittels durch Säulenpuffer und Equilibrierung der Säule wurde die Absorption (280nm) auf den Nullwert eingestellt (*autozero*) und 200ml 0,2µm-gefilterter *Pichia*-Überstand durch das Pumpensystem auf die Säule appliziert (2ml/min). Anschließend erfolgte das Waschen der Säule, bei dem nicht gebundenes Protein von der Säule entfernt wird. Die Elution des gebundenen Muteins erfolgte durch einen stufenlosen NaCl-Gradienten von 0-1M bei einer Fraktionierung von 2ml. Der Muteingehalt in den gesammelten Fraktionen wurde anschließend durch spezifischen ELISA und Western Blot analysiert.

*FPLC-Lauf mit I-TAC(1-3)del.* Für die Heparin-Affinitätschromatographie von I-TAC(1-3)del wurde die FPLC-Anlage, ÄktaPurifier (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) mit folgenden Komponenten verwendet: Collector900, PH900, bla900 (Arbeitsgruppe Prof. Müller-Esterl, Biochemie, J.W. von Goethe-Universität Frankfurt). 40ml 0,45µm-gefilterter *Pichia*-Überstand wurden bei einer Auftragsgeschwindigkeit von 2ml/min auf die Säule appliziert, nicht gebundenes Protein durch Waschen entfernt und gebundenes Mutein durch einen stufenlosen NaCl-Gradienten von 0-1M (pH 6,5) bei einer Fraktionierung von 2ml eluiert. Der Muteingehalt in den gesammelten Fraktionen wurde anschließend durch spezifischen ELISA und Western Blot analysiert.

Tabelle 2-7: Material für FPLC

|                |                              |
|----------------|------------------------------|
| Heparin-Säule  | HiPrep 16/10 Heparin FF      |
| Säulenpuffer   | 20mM Tris, pH 6-7.4          |
| Elutionspuffer | 20mM Tris, 1M NaCl, pH 6-7.4 |

### 2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

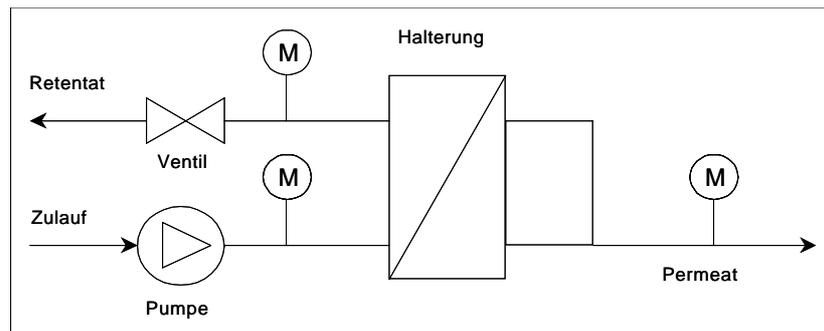
Die Konzentration von Gesamtprotein wurde unter Verwendung der BCA-Methode bestimmt. Die Methode basiert auf der Reduktion von  $Cu^{2+}$  zu  $Cu^{+}$  durch Protein in einem alkalischen Medium (Biuret-Reaktion) mit einer hoch sensitiven und selektiven Farbdetektion des Kupferkations ( $Cu^{+}$ ) durch Verwendung einer Bicinchoninsäure-Lösung (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce, USA). Das violette Reaktionsprodukt entsteht durch Chelatbildung von zwei Molekülen BCA mit einem Kupferion. Dieser Komplex zeigt eine starke Absorption bei

562nm, die bei steigender Proteinkonzentration in einem Rahmen von 20µg/ml bis 2000µg/ml linear ist. Die BCA-Methode wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung des Verhältnisses von spezifischem Muteingehalt zu Gesamt-Proteingehalt im *Pichia*-Überstand durchgeführt. Dazu wurden 50µl der Proteinprobe und der Standardreihe aus BSA mit 150µl einer Mischung aus 50 Volumen Puffer A (Bicinchoninsäure) und einem Volumen Puffer B (Cu(II)Sulfat-Pentahydrat) in einer 96-Lochplatte (Nunc) versetzt. Die Platte wurde gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 560nm mittels eines Spektral-Photometers der Firma Tecan (Tecan SpectraFluorPlus) und der Software Xfluor, Version V3.21. Die Ergebnisse wurden in Excel (Microsoft Office Professional, Edition 2003) verarbeitet und graphisch dargestellt.

### **2.2.6 Tangentialfluss-Filtration oder (Cross-Flow-Filtration)**

Für die Aufarbeitung und Konzentration mehrerer Liter an vMIP-II stand uns von der DFG eine sogenannte Tangentialflusss-Filtrationsanlage (*cross-flow filtration*) zur Verfügung. Bei dieser Anlage wird im Gegensatz zur normalen Filtration die Rohlösung rezirkuliert und tangential über eine Membran geführt. Diese Strömungsführung gewährleistet über einen langen Zeitraum eine gleichbleibende Produktivität der Membran. Der Tangentialfluss erzeugt eine Turbulenz an der Membranoberfläche und minimiert auf diese Weise die Konzentrationspolarisation. Während des Betriebes wird das Retentat, dessen Moleküle und Fragmente größer als die Membranporen sind, kontinuierlich rezirkuliert. Das Lösungsmittel und die gelösten Substanzen permieren die Membran und bilden das so genannte Permeat. Der Vorteil dieser Methode liegt zum einen darin, dass ein großes Volumen an Lösung verarbeitet werden kann, zum anderen setzt sich der Filter nicht so schnell zu.

Es wurden 1 und 100kDa Ultra-Slice-Filterkassetten (Schleicher&Schüll GmbH, Einbeck) über die Firma Sartorius (Göttingen) bezogen. 2-3 Liter vMIP-II wurden in einem ersten Schritt über den 100kDa-Filter geleitet, um Proteinmoleküle >100kDa abzutrennen. In einem zweiten Schritt wurde die Probe über den 1kDa-Filter geleitet, um eine Aufkonzentrierung des vMIP-II-enthaltenden *Pichia*-Überstandes zu erzielen. Der Prozess wurde bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Anschließend wurde die Probe im ELISA und Western Blot analysiert. Abbildung 2-1 zeigt eine Skizze des Filtrationsablaufs.



**Abb. 2-1: Cross-Flow-Filtration in schematischer Darstellung.** Über eine Peristaltikpumpe wird die Lösung am Filter vorbeigeleitet. Ein Teil rezirkuliert in das Ursprungsgefäß (Retentat), der andere Teil passiert den Filter und wird aufgefangen (Permeat). M: Druckmess-Ventil

### 2.2.7 Dialyse des Mutein-haltigen *Pichia*-Überstandes

Die Dialyse ist eine Methode, um z.B. Proteinproben durch den Vorgang der Osmose über eine semi-permeable Membran von niedermolekularen Substanzen zu befreien. Dabei werden große Moleküle durch die Membran zurückgehalten, während kleine Moleküle frei diffundieren können. Die Dialysemembran unterscheidet sich in ihrer Porengröße, die durch den MWCO-Wert (*Molecular Weight Cut Off*) angegeben wird. Dieser Wert gibt einen Anhaltspunkt über das Molekulargewicht der Proteine an, die zu 90% von der Membran ausgeschlossen werden. Die Dialyse wurde verwendet, um Mutein-enthaltenden *Pichia*-Überstand von niedermolekularen Substanzen zu befreien sowie Elutionsfraktionen der FPLC zu entsalzen.

Für Proteinvolumen bis 3ml wurden Dialysekassetten (*Slide-A-Lyzer cassettes*, MWCO 3500) der Firma Pierce nach Herstellerprotokoll verwendet. Der Dialysevorgang wurde unter vorsichtigem Rühren in 1x PBS (pH 6,5) bei 4°C über Nacht durchgeführt.

Für die Dialyse mit einem Größenausschluss von 1kDa wurden Dialysemembranen der Firma Spectrum Laboratories (Spectra/Por® CE (Cellulose ester), CA, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Proteinprobe wurde mit einer sterilen Pipette in den Membranschlauch gefüllt, durch Klips verschlossen und der Dialyseprozess wie beschrieben durchgeführt.

Zusätzlich wurden zwei verschiedene Materialien an Dialyseschläuchen verglichen und ausprobiert. Ein Dialyseschlauch aus regenerierter Cellulose und ein anderer aus Celluloseester (*Float-A-Lyzer™ System*, Spectra/Por® RC (*Regenerated Cellulose*) und CE (*Cellulose Ester*)).

### 2.2.8 Gefriertrocknung (Lyophilisierung) und Filtration von *Pichia*-Überstand

Die Gefriertrocknung (Lyophilisierung) bezeichnet eine Methode zur Aufkonzentrierung von gefrorenem Material durch Wasserentzug, ohne die Eigenschaften des Ausgangsmaterials zu verändern. Das Trocknen erfolgt dabei unter Umgehen des flüssigen Aggregatzustandes durch Sublimation, d.h. direkte Überführung von Eis in Dampf. Dies geschieht unter Vakuum, wobei allgemein im eingebrachten Material Temperaturen zwischen  $-10^{\circ}\text{C}$  und  $-70^{\circ}\text{C}$  herrschen.

Die Gefriertrocknung von I-TAC(1-3)del wurde als alternative Konzentrationsmethode zur Heparin-Affinitätschromatographie verwendet. Dafür wurde das System der Firma Bachofer (Reutlingen) verwendet. I-TAC(1-3)del-enthaltender *Pichia*-Überstand wurde in spezielle Zentrifugenröhrchen (Schott AG, Mainz) gefüllt und eingefroren. Das gefrorene Material wurde über sechs Stunden im Vakuum zentrifugiert und so auf  $\frac{1}{4}$  aufkonzentriert.

Im Anschluss an die Lyophilisierung wurde der Überstand zusätzlich durch Filtration über Centripreps (Millipore GmbH, Schwalbach) mit einem MWCO von 30.kDa von höhermolekularen Proteinen nach Herstellerprotokoll getrennt.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

Der Vektor pGEX-2T, der für das intakte murine MCP-1 Chemokin kodiert, wurde von Dipl.-Biol. Michael Wahl in seiner Dissertation hergestellt. Die Vektoren pMT/V5-HisBmCXCL11, der für das intakte I-TAC kodiert, und pTEJ8, der für vMIP-II kodiert, wurden uns freundlicherweise von Prof. G. Werner-Felmayer ((Institut für Medizinische Chemie und Biochemie, Universität Innsbruck, Österreich) bzw. Prof. Th. N. Kledal (Institut für Molekulare Pharmakologie, Panum Institut, Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Der *proofreading*-defiziente Stamm *E.coli* BMH 7118 (Clontech, BD Biosciences, USA) wurde in der Mutagenesereaktion für DNA-Manipulationen verwendet.

Die einzelnen Schritte, ausgehend von der Ligation der cDNA in den *Pichia* Expressionsvektor pPIC9(K) über die Transformation in *E.coli* bis hin zur Transformation der Mutein-cDNAs in *Pichia pastoris*, wurden nach dem Herstellerprotokoll der Firma Invitrogen (*Life Technologies*, Karlsruhe, Version M) durchgeführt und werden hier nur bei grobem Abweichen vom Herstellerprotokoll aufgeführt.

Die Herstellung von I-TAC und I-TAC(1-3)del erfolgte im Labor der Immunpharmakologie durch Dipl.-Ing. Elisabeth Werner (FH Hamburg, AG Prof. R. Luttmann) im Rahmen ihrer Masterarbeit und wird daher in dieser Arbeit nicht mehr in ihrer ausführlichen Methodik aufgeführt.

### 2.3.1 Kultivierung von *E.coli*

Für die Plasmidpräparation wurden mehrere *E.coli*-Klone über Nacht bei 37°C in Antibiotikahaltigem LB-Medium (nach Luria-Bertani) herangezogen. Dafür wurde das LB-Medium wie folgt angesetzt, autoklaviert und nach dem Abkühlen auf etwa 60°C mit 100µg/ml Ampicillin (*Invitrogen Life Technologies*, Karlsruhe) versetzt. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden 15g/L Agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) vor dem Autoklavieren zum LB-Medium zugegeben, die Lösung in sterile Platten gegossen, abgekühlt und umgedreht bei 4°C gelagert.

|                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| <b><u>LB-Medium:</u></b> | 10g NaCl,                      |
|                          | 5g Hefeextrakt,                |
|                          | 10g Trypton,                   |
|                          | ad 1L H <sub>2</sub> O, pH 7,0 |

### 2.3.2 Transformation von *E.coli*

100µl kompetente *E.coli*-Zellen (DH5α<sup>TM</sup>, *Invitrogen Life Technologies*, Karlsruhe) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-10ng Plasmid-DNA oder 1-5µl Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einem Hitzeschock ausgesetzt (42°C, 45s), 2

Minuten auf Eis abgekühlt, in 0,9ml SOC-Medium resuspendiert und für eine Stunde bei 225rpm und 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (1000rpm, 2min) wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in SOC-Medium aufgenommen, auf Ampicillin-haltigen Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht herangezogen.

Tabelle 2-8: Material für *E.coli*

|  |   |
|--|---|
| Agar   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Trypton  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                       |
| Hefeextrakt  |   |
| Max Efficiency DH5 $\alpha$ . <sup>TM</sup> kompetente Zellen, | <i>Invitrogen Life Technologies</i> , Karlsruhe |
| SOC-Medium   | Clontech, BD Biosciences, USA                   |
| <i>E.coli</i> BMH 7118 (kompetente Zellen)                     |   |
| Ampicillin   | <i>Invitrogen Life Technologies</i> , Karlsruhe |

### 2.3.3 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Alle *P. Pastoris* Plasmide und Hefeexpressionsreagenzien wurden von der Firma Invitrogen (*Life Technologies*, Karlsruhe) bezogen. Oligonukleotidprimer wurden von der MWG Biotech AG oder von Qiagen (Hilden) synthetisiert. Der HIS<sup>4</sup>-defiziente *P. pastoris*-Stamm SMD1168 wurde von Invitrogen (Version M) bezogen und ermöglicht die Expression vom Mut<sup>s</sup> oder Mut<sup>+</sup> Phänotyp (siehe Herstellerprotokoll).

### 2.3.4 Konstruktion der Proteinexpressionsvektoren

*Herstellung von MCP-1 und MCP-1(1-8)del.* Für die Herstellung der MCP-1-cDNA wurde RNA von Zytokin-stimulierten Mouse Thymomazellen, EL-4, als Template in einer RT-PCR verwendet. Diese cDNA, die für das intakte MCP-1 mit seiner nativen Signalsequenz kodiert, wurde in einer PCR mit den Primern mMCP-1/JE\_ sekS und mMCP/JE\_AS amplifiziert. Die durch PCR amplifizierten Fragmente wurden anschließend in *Bam*HI und *Eco*RI Restriktionsschnittstellen von pPIC9 kloniert. Zur Herstellung von MCP-1(1-8)del, bei dem die ersten acht Aminosäuren von MCP-1 fehlen, wurde die RNA aus den Cytokin-stimulierten Thymomazellen mit den Primern MJE2-S1 und mMCP-1/JE\_AS in cDNA umgeschrieben und das Fragment mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Sna*BI/ *Eco*RI in pPIC9 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde denaturiert und in einer *site-directed*-Mutagenesereaktion eingesetzt. Die einzelsträngigen Plasmide wurden als Template mit den Primern SELDel1 und MUTDel1 eingesetzt und die korrekte Amplifikation führt zum Verlust der *Bst*117I Restriktionsschnittstelle. Die amplifizierten Fragmente wurden mit *Bst*1107I ligiert und wiederum herausgeschnitten. Anschließend wurde der korrekturlese-defiziente *E.coli*-Stamm

BMH7118 mit dem Restriktionsansatz transformiert und eine Plasmidisolierung von gewachsenen Klonen durchgeführt. Der Verdau mit *Bst*1107I wurde wiederholt, gefolgt von einer weiteren *E.coli* DH5 $\alpha$  Transformation. Das dadurch entstandene Plasmid kodiert für das Fusionsprotein  $\alpha$ F-MCP-1(1-8)del, welches das Hefe  $\alpha$ F-Signalpeptid beinhaltet, jedoch das native Sekretionssignal und die ersten acht Aminosäuren von MCP-1 nicht enthält.

Tabelle 2-9: Herstellung von MCP-1 und MCP-1(1-8)del

| Oligo          | Sequenz (5'-3')                          |
|----------------|--|
| mMCP-1/JE_sekS | TCCTCCGGATCCA TGCAGGTCCCTGTCATGCTT       |
| mMCP-1/JE_AS   | GAGAATTCCTAGTTCCTACT GTCACA              |
| mMCP-1/JE2-S1  | TGTACGTACAGCCAGATGCAGTTA                 |
| SELDel1        | GCGATAGCGGAGTGTCTACTGGCTTAACTAT          |
| MUTDel1        | CTGGAGCATCCAGGTGTTAGCGCTCACCTGCTGCTACTCA |

*Herstellung von vMIP-II.* Die virale MIP-II DNA wurde mittels PCR mit den spezifischen Primern vMIP-II\_fw und vMIP-II\_rev von dem Plasmid pTEJ8 gewonnen. Amplifizierte Fragmente wurden mittels *Xho*I/ *Eco*RI in pPIC9 kloniert und ergaben das Fusionsprotein  $\alpha$ F-vMIP-II ohne die vMIP-II-eigene Signalsequenz. In Tabelle 2-10 sind unterstrichen die Nukleotide der Restriktionsschnittstellen *Xho*I (fw) und *Eco*RI (rev) dargestellt.

Tabelle 2-10: Herstellung von viralem MIP-II

| Oligo       | Sequenz (5'-3')   |
|-------------|---|
| vMIP-II_fw  | CGGCTAATGTCT <u>CGAG</u> AAAAGAGAGGCTGAAGCT<br>CTGGGAGCGTCCTGGCATAG |
| vMIP-II_rev | GCGCTATGTAGAATTCAGAT <u>CAAG</u> CAGTGACTGGTAATTGCTG                |

*Herstellung von wtl-TAC und I-TAC(1-3)del.* Natives ml-TAC und ml-TAC(1-3)del wurden ohne ihr Sekretionssignal von dem Vektor pMT/V5-HisBmCXCL11, der uns freundlicherweise von Frau Prof. Felmeyer zu Verfügung gestellt wurde, als *Template* in einer PCR mit korrekturlesefähiger *Pfx*-Polymerase amplifiziert. Dazu wurden für wtl-TAC die Primer wtl-TAC\_fw und wtl-TAC\_rev und für I-TAC(1-3)del die Primer I-TAC(1-3)del\_fw und wtl-TAC\_rev verwendet. Die generierten cDNAs wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I (*Invitrogen Life Technologies*, Karlsruhe) in den geschnittenen Vektor pPIC9K kloniert. Dafür weisen die verschiedenen *forward*-Primer am 5'-Ende eine *Eco*RI-Restriktionsschnittstelle auf, während die *reverse*-Primer am 3'-Ende eine *Not*I-Schnittstelle haben. Der Vektor pPIC9K wurde mit diesen Enzymen linearisiert und über Nacht mit einer T4-DNA-Ligase (*Invitrogen Life Technologies*, Karlsruhe) ligiert. Das Ergebnis ist das Fusionsprotein  $\alpha$ F-I-TAC (255bp) und  $\alpha$ F-I-TAC(1-3) del (246bp). Die Transformation in

*E.coli* erfolgte mittels Hitzeschock und die Selektion der I-TAC cDNA-enthaltenden Klone wurde auf Ampicillin-haltigen LB-Platten nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Durch die Aufnahme des Plasmids erhalten die Zellen die Ampicillinresistenz, die ihnen das Wachsen auf LB-Amp-Platten ermöglicht. Anschließend wurden positive Kolonien gepickt und auf Vorliegen der Insert-cDNAs überprüft. Dazu wurde eine Übernachtskultur der positiven wt-I-TAC Klone und der positiven I-TAC(1-3)del Klone angesetzt und die Plasmid DNAs mittels Qiaprep® Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll isoliert.

Für wt-I-TAC wurde die Insert-Überprüfung mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *NotI* nach folgendem Ansatz durchgeführt und für drei Stunden bei 37°C inkubiert:

|                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| <u>Restriktion der Vektor-DNA:</u> | 10µg Vektor-DNA             |
|                                    | 10µl <i>NotI</i> (10U/µl)   |
|                                    | 10µl <i>EcoRI</i> (10U/µl)  |
|                                    | 20µl 10x Restriktionspuffer |
|                                    | 127µl H <sub>2</sub> O      |

Der Integrationsnachweis für I-TAC(1-3)del wurde mittels PCR und AOX1-Primern durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.3).

Tabelle 2-11: Herstellung von wt I-TAC und I-TAC(1-3)del

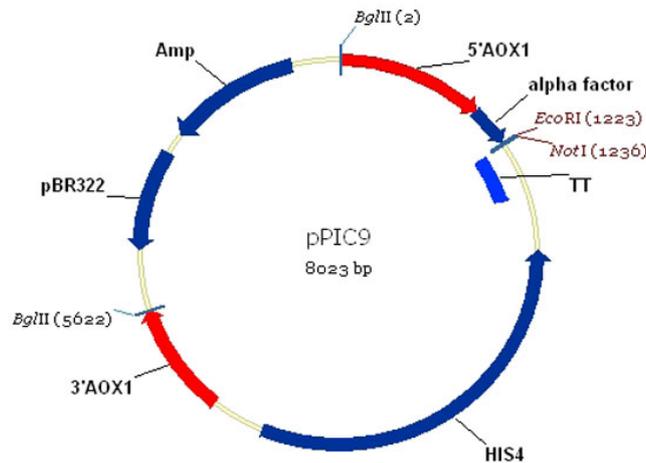
| Oligo            | Sequenz (5'-3')                     |
|------------------|-------------------------------------|
| wt I-TAC_fw      | GCATATGAATTCTTCCTTATGTTCAAACAGGGG   |
| wtl-TAC_rev      | ATGTCTTGCGGCCGCTACATGTTTTGACGCCTTAA |
| I-TAC(1-3)del_fw | GAATTCAAACAGGGGCGCTGTCTTTAA         |
| 5' AOX1          | GACTGGTTCCAATTGACAAGC               |
| 3' AOX1          | GCAAATGGCATTCTGACATCC               |

### 2.3.5 *P. pastoris* Transformation und Selektion

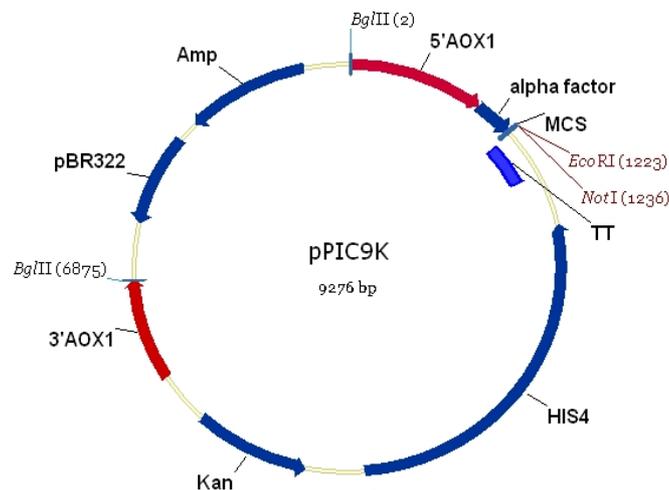
Plasmide, die für die sekretorischen Chemokine bzw. Muteine kodierten, wurden mit *BglII* linearisiert. *BglII* entfernt den Ampicillin/ColE1-Genort aus dem Vektor, der für die Transformation in *E.coli* noch notwendig war. Dies resultiert in ein linearisiertes DNA-Fragment für die homologe Rekombination in das *Pichia*-Genom. Zudem favorisiert eine Restriktion mit *BglII* die Ausbildung des Mut<sup>S</sup>-Phänotyps. Der *P. pastoris*-Stamm SMD1168 wurde anschließend mit diesen linearisierten Fragmenten mittels LiCl-Methode nach Herstellervorgaben transformiert. Klone mit stabil integrierten Plasmiden wurden herangezogen und nach Herstellerprotokoll selektiert.

### 2.3.6 Vektoren: pPIC9 und pPIC9K

Der Expressions-Vektor pPIC9K (Invitrogen GmbH, Nr. V175-20) ermöglicht die Generierung von *Pichia*-Stämmen, die multiple Kopien des Zielgens enthalten. Zudem besitzt der pPIC9K Vektor eine  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz, die die Sekretion des Zielproteins in das Medium bewirkt.



**Abb. 2-2: *Pichia pastoris* Expressionsvektor pPIC9.** Die Vektorkarte zeigt die wichtigen Sequenzen für sowohl für die Klonierung von wtMCP-1, MCP-1(1-8)del und vMIP-II in den Vektor als auch für die Transformation des Vektors in das *Pichia*-Genom.



**Abb. 2-3: *Pichia pastoris* Expressionsvektor pPIC9K.** Die Vektorkarte zeigt die wichtigen Sequenzen sowohl für die Klonierung von wt I-TAC und I-TAC(1-3)del in den Vektor als auch für die Transformation des Vektors in das *Pichia*-Genom.

**5' AOX1:** 1000bp Fragment; enthält den *AOX1* Promotor. Ermöglicht die Methanol-induzierte Expression in *Pichia*.

**$\alpha$ -Faktor Signalsequenz:** 269 bp Fragment; kodiert für die Signalsequenz in *Pichia*, die die Sekretion in das Medium erlaubt.

**MCS:** (*multiple cloning site*). Enthält viele Restriktionsschnittstellen, die die Insertion des Zielgens ermöglichen.

**TT:** 260pb Fragment: Transkriptions-Terminations- und Polyadenylierungssignal des *AOX1*-Gens. Sorgt für eine effiziente Transkriptionstermination und Polyadenylierung der mRNA.

**HIS4:** 2,4kb Fragment; kodiert für die Wildtyp Histidinol-Dehydrogenase und dient als Selektionsmarker für rekombinante *Pichia*-Stämme.

**3' AOX1:** ~650bp Fragment; *AOX1*-Sequenz, die in 3' Richtung des TT-Signals angeordnet ist und die Plasmid-Integration am *AOX1*-Genort festlegt.

**Ampicillin, ColE1:** Ampicillin-Resistenzgen und *E.coli*- Replikationsursprung. Erlaubt die Selektion, Replikation und Erhaltung in *E.coli*.

**NotI, BglII, SacI, SalI:** Einzeln vorkommende Restriktionsschnittstellen. Erlaubt die Linearisierung des Vektors für eine effiziente Integration in *Pichia* und die Generierung von Mut<sup>+</sup>- und Mut<sup>S</sup>-Rekombinanten.

**Kanamycin:** 815bp Fragment; Kanamycin-Resistenzgen von *Tn903*; verleiht Resistenz gegen Geneticin<sup>®</sup> in *Pichia* und Kanamycin-Resistenz in *E.coli*.

### 2.3.7 Proteinexpression durch *Pichia pastoris*

#### Schüttelkolben-Kultivierung

Für die Herstellung größerer Mengen des jeweiligen Antagonisten wurden die entsprechenden *P. pastoris*-Klone, in denen in den Vorarbeiten eine hohe Proteinsekretion gesichert wurde, in 5ml BMG-Medium über Nacht herangezogen. Davon wurden 1-5ml verwendet, um 100ml BMG-Medium in einem 500ml-Kolben anzuzüpfen. Die Kulturen wurden bei 196rpm und 30°C inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 2-6 erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen bei 3000x g für zehn Minuten pelletiert und in 30ml BMM-Medium (BMM = BMG ohne Glycerin, dafür mit 0,5% Methanol) aufgenommen, um die Proteinexpression zu initiieren. Alle 24 Stunden wurde der Kultur eine Probe entnommen, deren Proteingehalt im ELISA bestimmt wurde, während der Restkultur 0,5% Methanol zur weiteren Induktion zugegeben wurden. Neben der Schüttelkolben-Kultivierung im eigenen Labor, die nur für kleine Volumina bis zu einem Liter durchgeführt werden konnte, wurde ein Großteil an I-TAC(1-3)del im Labor von Dr. C. Reinhart im MPI für Biophysik (Frankfurt am Main) hergestellt. Durch die Verwendung von 10L-Kolben konnten insgesamt 28 Liter I-TAC(1-3)del durch diese Kooperation generiert werden.

Tabelle 2-12: Medien für die *Pichia pastoris*-Kultivierung

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>BMG-Medium (500ml):</b> | 350ml steriles H <sub>2</sub> O,<br>50ml 1M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0,<br>50ml 10x YNB-Lösung,<br>1ml 500x Biotin,<br>50ml 10x Glycerin |
| <b>BMM-Medium (500ml):</b> | 350ml steriles H <sub>2</sub> O,<br>50ml 1M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0<br>50ml 10x YNB-Lösung,<br>1ml 500x Biotin,<br>50ml 10x Methanol  |

Tabelle 2-13: Stammlösungen für *Pichia*-Medien

|   |  |
|---|--|
| 1M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0:                                  | 132ml 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,<br>868ml 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| 10x Glycerin:   | 100ml Glycerin,<br>900ml H <sub>2</sub> O  |
| 10x Methanol:   | 5ml Methanol,<br>95ml H <sub>2</sub> O   |
| 10x Yeast Nitrogen Base (YNB):                                    | 134g YNB,<br>add 1L H <sub>2</sub> O   |
| 500x Biotin:  | 20mg Biotin,<br>100ml H <sub>2</sub> O   |
| Stammlösungen wurden mittels Stericup (Millipore) sterilfiltriert |  |

*Hochzelldichte-Kultivierung*

Der Großteil der hergestellten Muteine wurde durch Hochzelldichte-Kultivierung in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. R. Luttmann (Abteilung für Bioprozessautomatisierung, FH Hamburg) hergestellt. Die Expression der rekombinanten Chemokinrezeptor-Antagonisten erfolgte in einem vollautomatisierten Bioreaktor (BIOSTAT ED10) mit einem Arbeitsvolumen von 10 Litern, bei dem sowohl die konstante Methanolzufuhr als auch der Zu- und Abfluss von Nähr- sowie Abfallstoffen computertechnisch überwacht und kontrolliert werden kann (G. Cornellissen et al., 2003). Durch diese Technik kann eine fünf- bis zehnfach höhere Zelldichte und Produktausbeute erzielt werden. Das Prinzip dieser automatisierten Hochzelldichte-Kultivierung wurde in der Masterarbeit von Frau Dipl.-Ing. Elisabeth Werner detailliert beschrieben.

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 ELISA

Beim ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) verwendet man spezifische Antikörper zum Nachweis von Proteinen und Peptiden in einer Lösung, wie Serum, Urin oder Kulturüberstand. Prinzipiell wird der direkte und der indirekte ELISA unterschieden. Beim direkten ELISA bindet der Primärantikörper das Festphasen-gebundene Antigen. Im zweiten Inkubationsschritt wird dieser Antikörper durch einen Peroxidase-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen und nach einer dritten Inkubation werden die gebundenen Antikörper durch eine Farbreaktion mit einer Chromogen-Substratlösung dargestellt. Die Extinktion der entstehenden Farblösung ist proportional zur Antikörperkonzentration in der Lösung. Beim indirekten ELISA, der eine höhere Sensitivität aufweist, wird der Primärantikörper an die Festphase gebunden und nachfolgend mit dem Antigen und dem Sekundärantikörper inkubiert, so dass das Antigen von zwei Seiten mit Antikörpern eingehüllt ist (*Sandwich*).

#### ***Direkter ELISA für vMIP-II und I-TAC(1-3)del***

100µl/Loch verschiedener Verdünnungen von vMIP-II oder I-TAC(1-3)del-enthaltenden *Pichia*-Überstandes in TBS (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,3) wurden auf eine 96-Lochplatte (Immunoplate, Nunc) gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Rekombinantes vMIP-II oder ml-TAC (R&D Systems GmbH, Wiesbaden) wurde als Standard verwendet (25-1600ng/ml). Die Platte wurde am folgenden Tag einmal vorsichtig abgeschlagen, jedes Loch wurde mit 3% BSA/TTBS (TBS + 0,05% Tween-20) versetzt und die Platte bei 37°C für 1,5 Stunden inkubiert. Die Löcher wurden anschließend dreimal mit TTBS gewaschen, mit je 50µl des jeweiligen ersten Antikörpers versetzt (Anti-Maus I-TAC/CXCL11 Ak (1:200) oder Anti-HHV-8 vMIP-II Ak (1:1000), R&D Systems GmbH, Wiesbaden) und für 2 Stunden bei RT belassen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Sekundärantikörper (biotinyliertes Kaninchen Anti-Ziegen-IgG, Dianova, Hamburg) in 1% BSA/TTBS verdünnt, je 50µl der Lösung pro Loch zugegeben und die Platte für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Löcher mit 50µl Streptavidin (Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*, 1:200)) überschichtet, für 60 Minuten bei RT inkubiert und nach einem zweiten Waschen erfolgte die TMB-Färbung. Dafür wurden 150µl der TMB-Lösung in jedes Loch gegeben, die Reaktion wird bei gewünschter Intensität durch 1M Schwefelsäure gestoppt und die Platte bei 450nm in einem Spektral-Photometer (Tecan SpectraFluorPlus, XFluor-Software, Version V3.21) ausgewertet.

Tabelle 2-14: Material Direkter ELISA

|                   |   |
|-------------------|---|
| Verdünnungspuffer | 1% BSA in TTBS  |
| Blockpuffer       | 3% BSA in TTBS  |
| Waschpuffer       | TTBS  |
| TMB-Lösung        | 9ml Substratpuffer,<br>1ml DMSO,<br>15µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,<br>1mg TMB (Fluka) |
| Substratpuffer    | 8,2g Natriumacetat,<br>21g Citrat,<br>1L H <sub>2</sub> O,<br>pH 4,9                        |
| Stopplösung       | 1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   |

**Sandwich-ELISA für MCP-1 und MCP-1(1-8)del**

Beim indirekten oder *Sandwich*-ELISA wurde die 96-Lochplatte (Immunoplate, Nunc) mit 100µl/Loch in Beschichtungspuffer verdünntem spezifischen ersten Antikörper (Anti-mJE/MCP-1 Ak, 1µg/ml, R&D Systems) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (1x PBS mit 0,05% Tween) wurde die Platte mit Blockpuffer für 1-2 Stunden bei RT abgesättigt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Standardreihe aus rekombinantem MCP-1 (31,2-1000pg/ml) und die Proben des MCP-1 oder MCP-1(1-8)del-enthaltenden *Pichia*-Überstandes mit je 100µl/Loch auf die Platte aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Biotin Anti-Maus JE/MCP-1 Ak, 0,5µg/ml, R&D Systems) den Löchern zugegeben und die Platte für 4 Stunden bei RT belassen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Streptavidin, die TMB-Färbung und die Detektion (siehe direkter ELISA).

Tabelle 2-15: Material *Sandwich*-ELISA

|                     |  |
|---------------------|--|
| Verdünnungspuffer   | 1% BSA in PBS  |
| Beschichtungspuffer | 10,56g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub><br>8,4g NaHCO <sub>3</sub><br>add 1L H <sub>2</sub> O<br>pH 9,6 |
| Blockpuffer         | 1% BSA in PBS  |
| Waschpuffer         | PBST   |
| Färbelösung         | TMB-Lösung   |
| Stopplösung         | 1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  |

### 2.4.2 Western-Blot-Analyse und ECL-Detektion

Mit dem Western-Blot (Immunoblot) können Proteine spezifisch nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel und Transfer auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) nachgewiesen werden. In einer Suspension aus Gesamt-Protein kann durch spezifische Antikörper das exprimierte Fremd-Protein angefärbt und Mengen ab 1ng nachweisen werden. Das Protein ist in der Größe durch mitgeführte Standards bestimmbar und kann auch unter bestimmten Voraussetzungen quantifiziert werden.

Der Western-Blot wurde eingesetzt, um die Expression des jeweiligen Chemokinrezeptor-Antagonisten im *Pichia*-Überstand nachzuweisen und die Molekülgröße jedes spezifischen Muteins abzusichern und um einen Rückschluss auf eventuelle Multimerbildung oder post-translationale Modifikationen (z.B. Glykosilierung) der exprimierten Muteine zu erlangen. Das Übertragen der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte im Naßblot-Verfahren mit der *semi-dry* Blot-Apparatur von Consort N.V. und den aufgelisteten Puffern. Der Proteintransfer erfolgte über 90 Minuten bei 80mA. Nach Beendigung des Transfers und dem Auseinanderbauen des Blots wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet oder die Detektion durchgeführt.

Die geblottete Membran wurde eine Stunde bei RT in Blockierungspuffer auf einem Horizontalschüttler blockiert und dann mit dem primären Antikörper in Blockierungspuffer (PBS/0,1% BSA) eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde dann 3x mit PBS/ 0,1% Tween20 für je 5 Minuten durch Schwenken gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers in Blockierungspuffer für 60 Minuten bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schwenken. Nach viermaligem Waschen mit PBS/ 0,1% Tween-20 erfolgte die Inkubation der Membran mit HRP-gekoppeltem Streptavidin und die Detektion durch Schwärzung eines Röntgenfilms bei Chemilumineszenz-Substraten. Die Chemilumineszenz wurde mit den ECL-Detektionsreagenzien (*Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg*) nach den Angaben der Hersteller erzeugt. Durch Variation der Auflegezeit des Röntgenfilms auf die Membran konnten unterschiedlich starke Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Als Größenstandard wurde der *Multimark Protein Molecular Weight Marker (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)* verwendet.

Tabelle 2-16: Material für Western Blot

|                    |   |
|--------------------|---|
| Whatman-Papier     | Fluka   |
| Blockierungspuffer | PBS/0,1% BSA  |
| Röntgenfilm        | Hyperfilm™ ECL™, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg |
| Filmkassette       | Hypercassette™, Amersham                                    |

Tabelle 2-17: Verwendete Antikörper

| Primäre Antikörper:                      | Verdünnung | Firma                  |
|--|------------|------------------------|
| Anti-mouse JE/MCP-1/CCL2                 | 1:1000     | R&D Systems, Wiesbaden |
| Anti vMIP-II                             | 1:2000     | R&D Systems, Wiesbaden |
| Anti-mouse I-TAC/CXCL11                  | 1:2000     | R&D Systems, Wiesbaden |
| Sekundäre Antikörper:                    | Verdünnung | Firma                  |
| Biotinyliertes Kaninchen Anti-Ziegen IgG | 1:10000    | Dianova, Hamburg       |
| HRP-Streptavidin                         | 1:200      | R&D Systems, Wiesbaden |

## 2.5 Zellbiologische Methoden

### 2.5.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung und Vermehrung von Säugerzellen wurde nach Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (*Kendro Laboratory Products GmbH, Heraeus, BBD 6220*) durchgeführt.

#### *Th1 IF12-Zellen:*

Die Th1IF12-Zellen wurden in einer mittleren Zellkulturflasche (75cm<sup>2</sup>) mit einer finalen Konzentration von 5ng/ml hIL-2 bei Standardbedingungen in 30ml Endvolumen stehend kultiviert. Dienstags und freitags wurden die Zellen in Falcon-Röhrchen (50ml, Greiner) überführt, bei 1000rpm 5 Minuten zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. 7,5x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in frischem vorgewärmten Medium aufgenommen, in eine Kulturflasche überführt und weiter kultiviert. Die Th1IF12-Zellen müssen in regelmäßigen Abständen restimuliert werden, damit sie ihre Ovalbumin (OVA) -Spezifität nicht verlieren (Radeke et al., 2002).

Die murinen dendritischen Zellen XS52 wurden in 10ml Medium in einer 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche zu 2,5x 10<sup>6</sup> Zellen ausgesät und liegend und mit 5ng/ml GM-CSF kultiviert.

Für die Durchführung der Chemokin- und Chemokinrezeptor-Charakterisierung wurden zudem murine Mastzellen und murine Mesangiumzellen verwendet. Tabelle 2-18 fasst die Kulturmedien für die jeden Zelltyp zusammen.

Tabelle 2-18: Medien

|   |  |
|---|--|
| <b>Murine Th1-Zellen (TH1IF12):</b><br>500ml RPMI 1640, Gibco<br>5ml L-Glutamin, final 2mM/ml<br>5ml Penicillin/Streptomycin, Gibco<br>5ml Nicht-Essentielle Aminosäuren (NEA)<br>50ml Fetales Kälberserum, final 10% (FKS) | <b>Murine Dendritische Zellen (XS52)</b><br>500ml Iscoves Medium, Biochrom<br>5ml L-Glutamin, final 2mM/ml<br>5ml Penicillin/Streptomycin, final 100U/100µg<br>12,5ml FKS, final 2,5%  |
| 5ng/ml hIL-2 als Wachstumsfaktor  | 5ng/ml mGMCSF als Wachstumsfaktor  |
| <b>Murine Mastzellen (mBMMCs)</b><br>500ml DMEM, Gibco<br>5ml Penicillin/Streptomycin, Gibco<br>IL-3, final 1%<br>KID-Ligand, final 1‰<br>50ml FKS, final 15%   | <b>Murine Mesangiumzellen (Balb/c - mMCs)</b><br>500ml RPMI 1640, Gibco<br>5ml L-Glutamin, final 2mM/ml<br>5ml Penicillin/Streptomycin<br>5ml NEA, final 1x<br>2,5ml Insulin, final 5µg/ml bzw. 125U/ml<br>1,75ml β-Mercaptoethanol (β-ME), final 45µM/ml<br>50ml FKS, final 10% |

### 2.5.2 Einfrieren und Auftauen von Th1-Zellen

Th1F12-Zellen wurden pelletiert, zu  $1 \times 10^6$  Zellen in 1ml Gefriermedium (RPMI1640, 10% DMSO, 90% FKS) aufgenommen und in sterile Gefrier Röhrchen (Nunc) abgefüllt. In speziellen Einfrierboxen (*Qualifreeze* Cryo-Einfriergeräte, Qualilab) wurden die Zellen langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank abgekühlt und nach 24 Stunden in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurde ein Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad erwärmt. Die noch nicht ganz aufgetauten Zellen wurden in 10ml vorgewärmtes Medium überführt, um das toxische DMSO schnell zu verdünnen. Nach einmaligem Zentrifugieren für fünf Minuten bei  $1000 \times g$ , wurden die Zellen in frisches Kulturmedium mit  $10 \mu\text{l}/10\text{ml}$  IL-2 als Wachstumsfaktor aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (Nunc,  $75\text{cm}^2$ ) transferiert.

### 2.5.3 Stimulierung von Säugerzellen

Für den Stimulierungszeitraum, in dem die Säugerzellen mit nachfolgenden Stimuli inkubiert wurden, wurde auf den unter normalen Kultivierungsbedingungen zugesetzten Wachstumsfaktor verzichtet. Die Stimulierung der Th1-Zellen für das Chemokinrezeptorprofil mit Concanavalin A erfolgte über 24 Stunden im Inkubator bei einer finalen Konzentration von  $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$  ConA. Die murinen Mesangiumzellen wurden für die Chemokin-Expressionsanalyse mit folgenden finalen Konzentrationen über 24 Stunden stimuliert: LPS ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $\text{mIFN-}\gamma$  (500U) und  $\text{hTNF-}\alpha$  (500U).

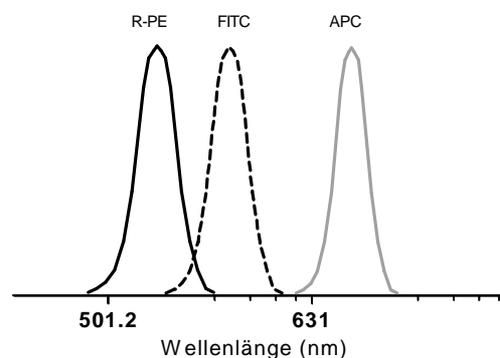
Für die Untersuchung der CXCR3-Signaltransduktion wurden Th1F12-Zellen je eine Stunde mit  $100 \mu\text{M}$  AG490 (Tyrphostin; Jak/STAT-Inhibitor) oder  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  Pertussis-Toxin bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend ein bis zweimal mit Medium gewaschen. Die Stammlösung des Kinase-Inhibitors wurde in sterilem DMSO (Sigma, München) angesetzt.

### 2.5.4 FACS-Analyse

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS-Analyse) handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit Hilfe fluoreszenzgefärbter Antikörper. Die verwendeten Geräte werden *fluorescence activated cell sorter* (FACS) genannt, auch wenn es sich um rein analytische Geräte ohne Sorterfunktion handelt. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl ( $\lambda=488\text{nm}$ ) vorbeigeleitet. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen, wobei die Strahlung über Linsen, Spiegel und Filter auf

Photodetektoren geleitet und verstärkt wird. Man erhält dadurch wichtige Informationen über die Zelle. Durch die Detektion des seitlichen Streulichts im *side scatter* (90°, SSC) erhält man Informationen über die Granularität der Zelle, während der Vorwärtsstreulicht-Detektor (*forward light scatter*, 0-10°, FSC) Informationen über die Größe der Zelle gibt.

Durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern können zusätzlich extra- und intrazelluläre Antigene identifiziert werden. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch den Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge gebundener Antikörper/Zelle. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Üblicherweise werden die Farbstoffe Fluorescein (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) verwendet, deren Exzitationsbereich um 488nm und deren Fluoreszenzstrahlung um 530nm (FITC), 575nm (PE), bzw. 660nm (APC) liegt.



**Abb. 2-4:** Emissionsspektren der Fluochrome Phycoerythrin (R-PE), Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und Allophycocyanin (APC) bei Anregung durch den FACS-Laser (488nm).

Die FACS-Analyse wurde zum einen für die Bestimmung der Chemokinrezeptor-Expression von CCR2, CCR5 und CXCR3 auf der Oberfläche von Th1-Zellen verwendet, zum anderen wurde die Liganden-induzierte Internalisierung von CXCR3 sowie der Einfluss eines Kinase-Inhibitors auf die Signalweiterleitung durch CXCR3 mittels dieser Methode untersucht.

*Expression von CCR2 und CCR5 auf Th1-Zellen.* Unter Standardbedingungen kultivierte Th1F12-Zellen wurden auf die gewünschte Zellzahl eingestellt ( $1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz), in FACS-Puffer (Cellwash, BD Pharmingen, San Diego, CA) oder PBS aufgenommen und die Ansätze auf 4ml-Röhrchen (BD Pharmingen, Heidelberg) verteilt. Die

Oberflächenexpression von CCR2 und CCR5 erfolgte durch Inkubation der Zellen mit je 5µg/ml Hybridomüberständen MC-21 (mCCR2) und MC-68 (mCCR5) für 60 Minuten auf Eis, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. D. Schlöndorff (Mack et al., 2001) zur Verfügung gestellt wurden. Als Isotypkontrolle diente Ratten-IgG2b (BD Pharmingen, Heidelberg). Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen und für 60 Minuten auf Eis mit einem Biotin-gekoppelten Anti-Ratten Sekundärantikörper (Dako, Hamburg) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Ansätze mit je 50µl RPE-gekoppeltem Streptavidin (DAKO, 1:10) versetzt und für 30 Minuten auf Eis und in Dunkelheit inkubiert. Nach dem finalen Waschschrift wurden die Zellen in 300µl FACS-Puffer oder PBS aufgenommen, in Alufolie vor Licht geschützt und am FACS-Gerät (FACScalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg) der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W.-H. Boehncke (Dermatologie, Klinikum der J.W. Goethe-Universität Frankfurt) mit der zugehörigen Software *GeneQuest* ausgewertet. Durch Propidiumiodid-Färbung wurde der Prozentsatz an toten Zellen bestimmt.

*Expression von CXCR3 auf Th1-Zellen.* Für die Oberflächenexpression von CXCR3 wurden zwei verschiedene Antikörper gegen CXCR3 verwendet. Zum einen ein in Kaninchen generierter Anti-Maus CXCR3-Antikörper der Firma Zymed (Zymed Inc., San Francisco, USA), gefolgt von einem Phycoerythrin-gekoppelten Esel anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg) und der passenden Isotypkontrolle (Kaninchen-IgG).

*Internalisierung von CXCR3.* Zum Nachweis der I-TAC-induzierten Internalisierung von CXCR3 bzw. dem Einfluss von verschiedenen Kinase-Inhibitoren (PTX, AG490) auf die I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung wurde ein in der Ratte generierter Anti-Maus CXCR3-Antikörper von R&D Systems verwendet, gefolgt von den oben genannten Reagenzien und geeigneter Isotypkontrolle (Ratten-IgG2a). Die Zellansätze wurden wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben bei 37°C stimuliert. Nach einmaligem Waschen mit einem sauren Puffer (50mM Glycin, 100mM NaCl, pH 3) wurden die Ansätze wie bereits dargelegt weiterbehandelt.

### **2.5.5 Kalzium-Mobilisierung**

Th1F12-Zellen ( $1 \times 10^7$  Zellen) wurden in 10ml Th1-Medium ohne fetales Kälberserum aufgenommen und bei 1100rpm für 5min zentrifugiert. 10µM Fluo-3 AM und 0,2% Pluronic F-127, in 100% sterilem DMSO gelöst, wurden der Zellsuspension zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C verdunkelt in einem Thermoschüttler (thermomixer compact, Eppendorf) bei 500rpm gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in 9ml vorgewärmtem HBSS (1x, pH 7,4) aufgenommen und noch zweimal mit 5ml HBSS gewaschen (1100rpm, 5min). Um den Farbstoff gleichmäßig zu lösen, wurden die Zellen in 1ml HBSS überführt und

für weitere 15 Minuten bei 37°C im Thermoschüttler belassen. Bis zur Verwendung wurde die Zellsuspension in Dunkelheit auf Eis aufbewahrt. Die Messung des Kalziumsignals erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Readers (*Fluorocount reader*, Packard) und der *Plate Reader*-Software Version 3.0. Dazu wurden 100µl Zellen in eine schwarze 96-Lochplatte (ViewPlate™ Packard) gegeben, gemischt und der Fluoreszenz-Basiswert wurde in einer automatisierten Messung alle 5 Sekunden bestimmt. Anschließend wurden 30µl Chemokin, Antagonist oder Kontrollreagenzien zu den Zellen appliziert, die Platte wiederum gemischt und die Fluoreszenzänderung (Ratio 485nm/520nm) alle fünf Sekunden über einen Zeitraum von drei Minuten bestimmt. Für die graphische Darstellung in *Graphpad Prism* wurde jeweils der Basiswert von der zugehörigen Messung abgezogen, um verschiedene Experimente vergleichbar zu machen.

Tabelle 2-19: Material Kalzium-Mobilisierung

|               |   |
|---------------|---|
| HBSS          | Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe |
| Pluronic-F127 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München      |
| Fluo-3 AM     | Molecular Probes Inc., USA              |
| DMSO          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München      |
| RPMI1640      | Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe |

### 2.5.6 Migration von Th1-Zellen (Chemotaxis)

Die Bioaktivität der generierten Muteine/Chemokine wurde anhand der Migration von Th1-Zellen in einem wiederverwendbaren 96-Loch-Migrationssystem (Neuroprobe, Gaithersburg, USA) überprüft. Eine 96-Lochplatte (30µl) wurde von den oberen Kavitäten der Kammer durch einen Polycarbonatfilter mit passender Porengröße für murine T-Zellen getrennt (3µm, Neuroprobe USA). Der Polycarbonatfilter wurde 1,5-2 Stunden vor dem Experiment mit 100µg/ml humanem Kollagen Typ IV (Sigma-Aldrich, München) oder Fibronectin (10µg/ml, Sigma-Aldrich, München) beschichtet. Dazu wurde der Filter mit der zu beschichtenden Seite in 800µl Lösung gelegt und auf einem Horizontalschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurden 30µl/Kavität rekombinantes Chemokin und/oder Antagonist in verschiedenen Konzentrationen in die unteren Löcher pipettiert und 100µl Th1-Zellen ( $1,5 \times 10^6$ /ml Zellen in 0,5% BSA/RPMI1640) in die oberen Löcher der Kammer gegeben. Die Migrationskammer wurde in Alufolie eingepackt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für zwei Stunden im Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension aus den oberen Kavitäten entfernt, die Kammer auseinandgebaut, Filter und 96-Lochplatte kurz anzenrifugiert (200rpm, 10s) und der Filter abgenommen. Die Färbung der gewanderten Th1-Zellen in den unteren Kavitäten mit DAPI erfolgte durch Zugabe von 20µl Färbelösung (1µg/ml DAPI, 1:10.000 in Methanol, Roche) pro Kavität und durch Inkubation der Platte bei 37°C für 15 Minuten in

Dunkelheit. Die Platte wurde zweimal mit 20µl/Loch PBS gewaschen (1000rpm, 4min) und anschließend mit einem halbautomatischen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200), welches einen fahrbaren Objektträgertisch, Hamamatsu-Kamera (C4742-95) und Openlab-Bildverarbeitungssoftware (Version 3; Improvision, Heidelberg) beinhaltet, ausgewertet. Es wurden von jeder Kavität vier Bilder aufgenommen, deren Mittelwert nachfolgend berechnet und graphisch dargestellt (*Graphpad Prism*, Version 4). Um verschiedene Experimente vergleichbar zu machen, wurde der Chemotaxis-Index (C.I.) bestimmt, der sich aus dem Quotienten der Zellzahl der ausgewerteten Kavitäten und der Mediumkontrolle errechnet. Alle Versuchsansätze wurden in Triplettet durchgeföhrt und die grafische Standardabweichung wurde mit  $\pm$ SEM dargestellt.

## 2.6 *In vivo*-Anwendungen

### 2.6.1 Intravitalmikroskopie (IVM)

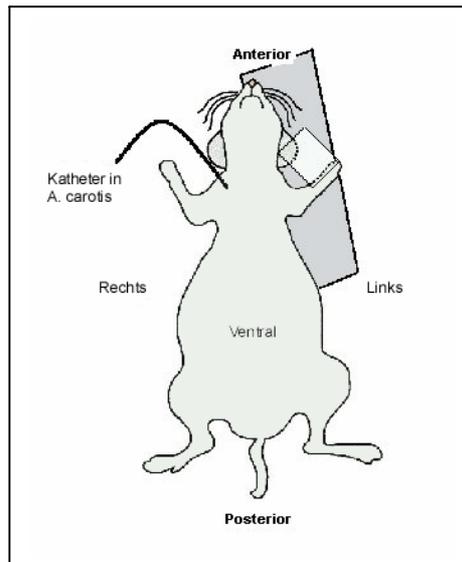
Die Intravitalmikroskopie ist eine moderne *in vivo*-Anwendung im Mausmodell zur Beobachtung der Interaktionen von exogen eingebrachten Immunzellen mit dem vorliegenden Gewebe. Dieses Verfahren wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W.-H. Boehncke (Zentrum für Dermatologie und Venerologie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt) angewandt, um u.a. die Rekrutierung von T-Lymphozyten in der Haut näher zu beleuchten. Die Durchführung der Intravitalmikroskopie am Mausohr gliedert sich in die Teilschritte a) Färbung der Zellen, b) Präparation der Maus und Versuchsdurchführung sowie c) die Auswertung des Versuchs.

#### a) Färbung

In dieser Arbeit wurden unstimulierte Th1F12-Zellen verwendet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE gefärbt. Dazu wurden 10µl der CFDA-Stammlösung (Molecular Probes, Eugene, Oregon; in 100µl DMSO gelöst) mit 100µl PBS (Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) versetzt und 3x 10<sup>7</sup>/ml Zellen mit 30µl der Suspension bei 37°C für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurden 70µl der Suspension zu den Zellen gegeben und diese für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal bei 1000rpm gewaschen, in AIM-Medium (Gibco) ohne FKS aufgenommen und bis zur Verwendung dunkel und warm gehalten.

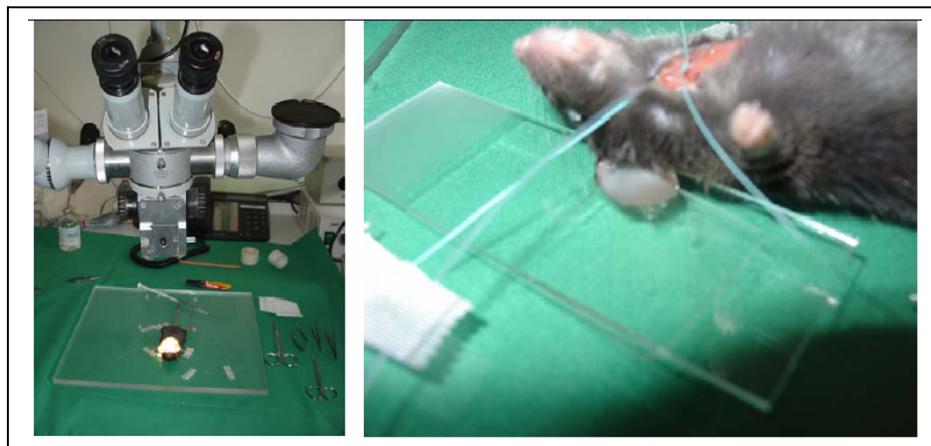
#### b) Präparation der Maus und Versuchsdurchführung

Eine 6-8 Wochen alte C57Bl/6-Maus wurde mit einer Lösung aus Ketamin und Rompun (900µl NaCl, 150µl Ketamin, 150µl Rompun; 200µl Lösung/20g Lebendgewicht) anästhesiert und ihre Körpertemperatur auf 37°C gehalten. Der Maus wurde durch eine Veterinärin retrograd ein Katheter in die rechte A. carotis gelegt. Der verwendete Katheter bestand aus PE-10 (Polyethylen) und war mit einer 1ml-Spritze verbunden. Nach Einbringen des Katheters wurde das linke Ohr der Maus vorsichtig auf einem Objektträger plaziert. Dabei war es wichtig, das Ohr nicht zu quetschen, um den Blutfluß nicht zu stören. Die Zugabe von Glycerin erleichterte das richtige Hinlegen des Ohrs auf dem Objektträger (Abb. 2-5).



**Abb. 2-5: Schematische Darstellung der Mauspräparation für die Intravitalmikroskopie (IVM).** Der anästhesierten Maus wird von ventraler Seite ein Katheter in die Arteria carotis gesetzt, das linke Ohr zwischen Deckglas und Objektträger gebracht und unter einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Skizze verändert von Dr. R. Ludwig, Dermatologie, Uniklinikum Frankfurt).

Anschließend wurde vorsichtig ein Deckglas auf das Ohr gelegt und transparentes Ultraschallgel aufgebracht, um eine mögliche Lichtstreuung bei Verwendung von Wasserimmersions-Linsen zu verhindern. Abbildung 2-6 zeigt zwei Bilder der Vorbereitung einer Maus für die IVM.



**Abb. 2-6:** Bilder der Vorbereitung einer Maus für die IVM (zur Verfügung gestellt von Dr. R. Ludwig, Dermatologie, Uniklinikum Frankfurt)

Die Bilder des Fluoreszenzmikroskops wurden über eine Kamera mit einem Videorekorder oder mit Hilfe eines PCs aufgenommen. Nach Aufsuchen eines geeigneten Betrachtungsareals mit einigen klar erkennbaren Gefäßen, wurden der Maus exogen vorbehandelte Zellen und/oder Antikörper über den Katheter injiziert. Diese injizierten Zellen sind nur kurze Zeit im Beobachtungsareal zu sehen, da sie in Lunge, Milz und Leber der Maus adhären und somit dem zirkulierenden Blutstrom entzogen werden. Gleichzeitig bedeutet dies, dass nach kurzem Intervall erneut Zellen appliziert werden können.

In dieser Arbeit wurde die Intravitalmikroskopie verwendet, um das Rollverhalten von Th1F12-Zellen zum einen nach Chemokinstimulus und zum anderen nach Behandlung mit dem Chemokinrezeptor-Antagonisten I-TAC(1-3)del zu beobachten.

Der Maus wurden in einem ersten Schritt unbehandelte Th1-Zellen injiziert und deren Rollverhalten im Gefäßsystem des Mausohrs als Leerwert über etwa zehn Minuten aufgenommen. In einem zweiten Schritt sollte das Rollverhalten durch Setzen eines IP-10-Depots im Mausohr gesteigert werden. Für das Setzen des IP-10-Depots musste die Maus vorsichtig aus der Apparatur herausgenommen werden. Es wurden 30µl IP-10 (10µg/ml, in PBS) in die Ohrhaut der Maus eingebracht, die Maus wieder wie beschrieben zur Beobachtung unter das Mikroskop gebracht und das zuvor betrachtete Gefäßareal durch das Mikroskop aufgesucht. Nach Injektion weiterer Th1-Zellen wurde das Rollverhalten nach IP-10-Stimulierung über mehrere Minuten beobachtet und aufgezeichnet. Im letzten Parameter wurde der mögliche inhibitorische Einfluss des Antagonisten I-TAC(1-3)del auf das zuvor durch IP-10 gesteigerte Rollverhalten der Th1-Zellen untersucht. Für 30 Minuten mit I-TAC(1-3)del (100µg/ml) bei 37°C vorinkubierte Th1-Zellen wurden der Maus injiziert. Das Verhalten der Zellen wurde für einige weitere Minuten mitgefilmt und schließlich ausgewertet.

### C) Auswertung

Für die Auswertung des Versuchs wurden mindestens zwei Gefäße untersucht und die sich darin bewegenden Zellen ausgezählt. Die Anzahl der rollenden und nicht rollenden Zellen wurde durch wiederholtes Anschauen der Videoaufzeichnungen ermittelt und tabellarisch zusammengefasst.

## 2.7 Statistik

Die Auswertung und Darstellung der Experimente wurde mittels *Graphpad Prism*-Software, Version 4 durchgeführt. Die Standardabweichungen wurden, wenn nicht anders angemerkt,  $\pm$ SD dargestellt und die Signifikanzen zwischen einzelnen Wertgruppen mit Hilfe des *Student's t*-Tests ermittelt.

### 3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in die drei folgenden Teile: 1) die Charakterisierung des T-Helfer-1-Klons und weiterer im Labor verwendeter Zellen, 2) die Herstellung und Aufreinigung der drei Chemokinrezeptor-Antagonisten MCP-1(1-8)del, vMIP-II und I-TAC(1-3)del und 3) funktionelle Untersuchungen zur Wirkung der Antagonisten an dem pro-inflammatorischen, nephritogenen T-Helfer-1 Lymphozytenklon IF12.

#### 3.1 Charakterisierung des murinen Th1-Lymphozytenklons IF12

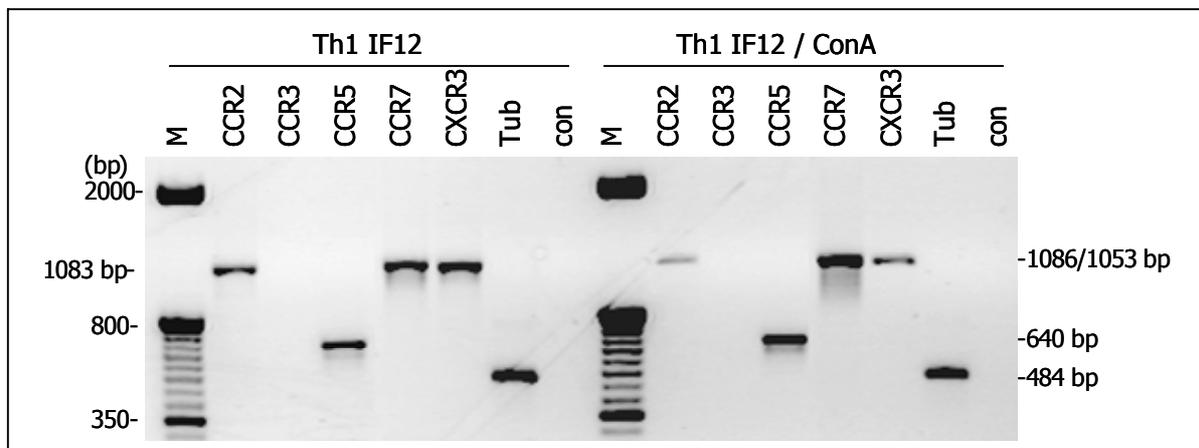
##### 3.1.1 Chemokinrezeptor-mRNA-Nachweis mit RT-PCR

Der Th1IF12-Zellklon wurde aus BALB/c-Lymphknotenzellen nach subkutaner Immunisierung mit Ovalbumin und *in vitro*-Differenzierung in Gegenwart von Interleukin-12 (IL-12) und Anti-Interleukin-4 generiert. Sowohl nach Stimulation mit dem kompletten Ovalbumin als auch mit dem immunodominanten OVA-Peptid 323-339 mit syngen APC weisen diese Zellen das typische Th1-Zytokinprofil auf, zu dessen Charakteristika die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2, nicht aber die Sekretion von IL-4 und IL-5 gehört. Der Th1-Klon ist zudem zu 99,7% CD4-positiv und war als einziger Lymphozytenklon in der Lage, *in vivo* eine transiente Nephritis in der T- und B-Zell-defizienten SCID-Maus auszulösen (Radeke et al., 2002).

Weil chronische Nierenentzündungen nicht nur im Mausmodell überwiegend durch krankheitstreibende, Th1-dominierte, mononukleäre Zellinfiltration gekennzeichnet sind, stellt dieser Th1IF12-Klon ein relevantes *in vitro*-Modell für die Validierung der Migrationshemmung durch Chemokinrezeptor-Antagonisten dar und wurde im Folgenden hinsichtlich seines Chemokinrezeptorprofils untersucht.

Da das Chemokinrezeptorprofil von Zelltyp zu Zelltyp variiert und zudem vom Stimulierungs- und Differenzierungszustand der Zelle abhängig ist, wurde das Chemokinrezeptorprofil der Th1IF12-Zellen auf RNA-Ebene mit Hilfe von RT-PCR und cDNA-Array untersucht. Dazu wurde RNA aus unstimulierten und Concanavalin A (ConA)-stimulierten Th1IF12-Zellen verwendet. Das Lektin ConA kommt unter anderem in der Zellwand von Bakterien vor und führt durch eine Vernetzung (*capping*) der relevanten T-Lymphozytenrezeptoren (TCR, CD3-Komplex) zu einer Aktivierung von T-Zellen als Basis einer Immunantwort. **Abbildung 3-1** zeigt exemplarisch aus einer Serie von RT-PCR-Experimenten den Nachweis von CCR2, CCR5, CCR7 und CXCR3 auf RNA-Ebene mit Hilfe spezifischer Primer, sowie den Einfluss der Lektinstimulation auf die Regulation dieser Rezeptoren.

Die linke Seite der **Abbildung 3-1** zeigt die konstitutive Expression der Chemokinrezeptoren unter kontinuierlichen Kulturbedingungen, die rechte Seite die Expression der Rezeptoren nach Aktivierung mit 2,5µg/ml ConA für 24 Stunden.



**Abb. 3-1: Nachweis der Chemokinrezeptor-Expression durch semi-quantitative RT-PCR.** Gesamt-RNA von Kontroll-ThIF12-Zellen und von ConA-stimulierten Zellen wurde in einer RT-PCR verwendet, um CCR2, CCR3, CCR5, CCR7 und CXCR3 mit spezifischen Primern nachzuweisen. Gezeigt ist hier ein Experiment aus einer Serie von maximal neun (siehe **Statistik-Tabelle 3-1**). M: 50bp DNA-Größenstandard; CCR2 (1083bp); CCR5 (640bp); CCR7 (1086bp); CXCR3 (1053bp); Tub:  $\beta$ -Tubulin (484bp) als konstitutive mRNA-Kontrolle; con: Wasserkontrolle.

Der CCR3-Rezeptor ist ein Merkmal für eosinophile Granulozyten oder T-Helfer-2-Lymphozyten. Sowohl unter Normalbedingungen als auch nach ConA-Stimulierung war kein Signal für den CCR3-Rezeptor auf RNA-Ebene nachweisbar. Die Präsenz der zum Th1-Profil von T-Zellen gehörenden Rezeptoren CCR2, CCR5, CCR6, CCR7 und CXCR3 (siehe zusammenfassende **Tabelle 3-1**) konnte mit dieser Methode eindeutig nachgewiesen werden. Für CCR2 und CXCR3, die klassische inflammatorische Rezeptoren darstellen, wurde in der RT-PCR eine verminderte Expression nach Lektin-Stimulierung detektiert. Für CCR5 und CCR6 konnte kein Einfluss von ConA mittels RT-PCR auf RNA-Ebene gezeigt werden.

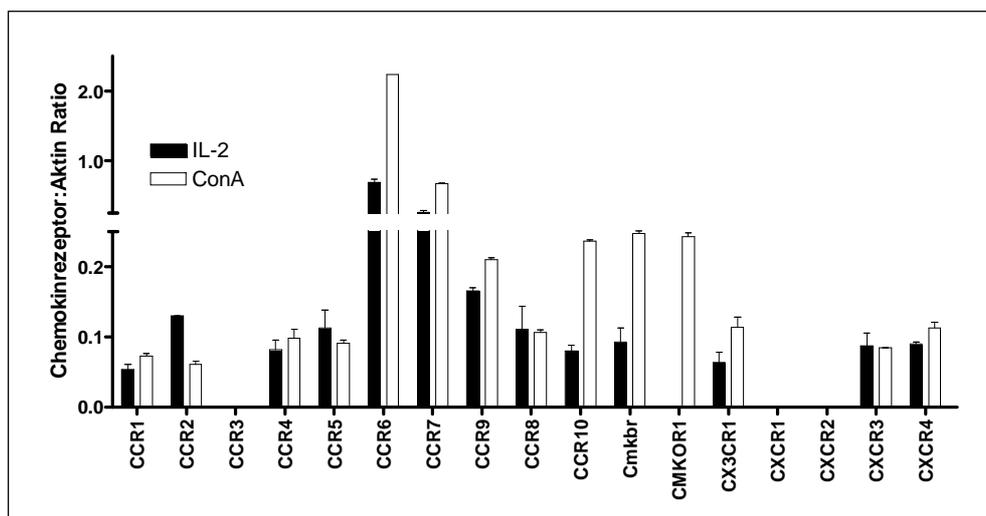
Naive und zentrale Gedächtnis- (*central memory*) T-Helfer-Zellen zirkulieren in sekundären Lymphorganen in Abhängigkeit von CCR7-Liganden ELC/CCL19 und SDF-1/CCL21. In diesem Sinne wurde die Expression des Rezeptors CCR7 in der Literatur (Sallusto et al., 2001) als ein wesentlicher Indikator für den Gedächtniszell-(oder *central memory*) Th1-Zelltyp festgelegt. Das Signal für CCR7 wurde nach Lektin-Stimulierung signifikant hochreguliert. **Tabelle 3-1** fasst die Statistik über alle durchgeführten RT-PCR-Experimente zusammen.

| Chemokin-rezeptoren | n= | Kontrolle    | ConA        | p=      | Effekt der Th-1-Aktivierung |
|---------------------|----|--------------|-------------|---------|-----------------------------|
| CCR1                | 2  | 0,05 ± 0,01  | 0,50 ± 0,14 | 0,0869  | n.s.                        |
| CCR2                | 8  | 0,71 ± 0,06  | 0,55 ± 0,06 | 0,0739  | n.s.                        |
| CCR3                | 9  | 0            | 0           |         | n.d.                        |
| CCR5                | 9  | 0,93 ± 0,05  | 0,99 ± 0,04 | 0,2683  | =                           |
| CCR6                | 4  | 0,83 ± 0,07  | 0,80 ± 0,08 | 0,8453  | =                           |
| CCR7                | 6  | 0,73 ± 0,049 | 0,98 ± 0,05 | 0,0039  | ↑                           |
| CXCR3               | 9  | 1,15 ± 0,06  | 0,46 ± 0,05 | <0,0001 | ↓                           |

**Tabelle 3-1: Statistische Zusammenfassung der semi-quantitativen RT-PCR-Analysen zum Chemokinrezeptorprofil des Th1F12-Zellklons.** RNA-Extrakte von Kontrollzellen (5ng/rhIL-2) und ConA-stimulierten Th1F12-Zellen wurden in der RT-PCR verwendet. Die densitrometrische Auswertung der Signale erfolgte mittels TINA-Software. Die Standardabweichung ist  $\pm$ SD dargestellt und die Signifikanzen wurden mittels Student *t*-Test ermittelt. Die Werte geben die Ratio von Chemokinrezeptor-mRNA gegenüber der  $\beta$ -Tubulin-Kontroll-mRNA an. n: Anzahl der Experimente;  $\uparrow$ : signifikant heraufreguliert;  $\downarrow$ : signifikant herunterreguliert; n.s.: nicht signifikant; n.d.: nicht detektiert; =: gleich bleibend.

### 3.1.2 Bestimmung des Chemokinrezeptorprofils mit cDNA-Arrays

Zur besseren Quantifizierung der Chemokinrezeptor-Expression und -Regulation wurden zusätzlich zur RT-PCR cDNA-Arrays durchgeführt. **Abbildung 3-2** zeigt exemplarisch aus einem Versuch (n=4) die im cDNA-Array detektierten Chemokinrezeptoren CCR1-10, CXCR1-4 und CX3CR1 (Fraktalkin-Rezeptor) sowie den Einfluss der Lektin-Stimulierung auf die Regulation dieser Rezeptoren.



**Abb. 3-2: Bestimmung des Chemokinrezeptorprofils von Th1F12-Zellen mit Hilfe des cDNA-Arrays.**  $^{32}$ P-markierte cDNA-Sonden aus umgeschriebener mRNA aus Th1-Lymphozyten wurden mit gen-spezifischen cDNA-Fragmenten hybridisiert. Densitrometrisch ausgewertete Signale, die mit der cDNA von kontinuierlich in Gegenwart von IL-2 kultivierten Kontrollzellen erzielt wurden, sind als schwarze Säulen dargestellt. Signale, die mit der cDNA von ConA-stimulierten Zellen erhalten wurden, sind als weiße Säulen dargestellt. Die Werte zeigen die Ratio aus der Chemokinrezeptor-cDNA und einer Aktin-Kontroll-cDNA. Die Abbildung zeigt beispielhaft ein Ergebnis aus einer Serie von vier Experimenten.

Von 17 mit Hilfe des cDNA-Array prinzipiell detektierbaren Chemokinrezeptoren waren 14 in den Th1F12-Zellen auf mRNA-Ebene nachweisbar. Wie bereits erwähnt wird CCR7 für die Lymphknoten-Rezirkulation von naiven und *central memory* T-Zellen verwendet. Neben CCR7 exprimieren diese beiden Klassen von T-Lymphozyten auch L-Selektin. *Central memory* T-Zellen besitzen jedoch noch eine breitere migratorische Kapazität und benutzen zusätzlich zu CCR7 auch CXCR4, um zu den Lymphknoten zu wandern. Zudem exprimieren sie weitere Chemokinrezeptoren wie CXCR5, CXCR3 und CCR4 (Sallusto et al., 2004).

Für CCR4 ist bekannt, dass er in aktivierten T-Zellen rapide heraufreguliert wird, während Rezeptoren wie CCR5 und CXCR6 von Th1-Zellen nach Stimulation selektiv herunterreguliert werden. Übereinstimmend mit diesen Daten zeigte das Ergebnis des cDNA-Arrays eine Heraufregulation der so genannten Lymphknoten-*homing* Rezeptoren CCR7 und tendenziell auch CXCR4, sowie interessanterweise der für eine Rezirkulation in die Haut typischen Rezeptoren CCR4 und CCR6. Übereinstimmend mit der Literatur konnte zudem eine konstitutive Expression von CCR8 und CCR10 detektiert werden, Rezeptoren, die für das *homing* in die Haut von Bedeutung sind (Sallusto et al., 2004). Wie in der Diskussion ausgeführt, ist dies möglicherweise eine Folge der Ausbildung dieses T-Lymphozytenklons durch Ovalbumin-Immunisierung aus dem Hautkompartiment stammender Langerhans-Zellen (Radeke et al., 2002). Wie in der statistischen Auswertung aller cDNA-Arrays in **Tabelle 3-2** dargestellt, ist eine selektive Herunterregulation nach ConA-Stimulierung für die Rezeptoren CCR2 und CCR5 zu erkennen, während in diesem Einzelexperiment die CXCR3-Herabregulation nicht eindeutig ist.

| CRs   | n = | Kontrolle   | ConA        | P=      | Effekt der Th1-Aktivierung |     |
|-------|-----|-------------|-------------|---------|----------------------------|-----|
| CCR1  | 4   | 0,01 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | 0,3497  | n.s.                       | 2)  |
| CCR2  | 4   | 0,16 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 | <0,0001 | ↓                          | 1a) |
| CCR3  | 4   | -           | -           | -       | n.d.                       | 1b) |
| CCR4  | 4   | 0,02 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 0,0171  | ↑                          | 2)  |
| CCR5  | 4   | 0,09 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | <0,0001 | ↓                          | 1a) |
| CCR6  | 4   | 0,69 ± 0,03 | 2,98 ± 0,05 | 0,0006  | ↑                          | 1a) |
| CCR7  | 4   | 0,19 ± 0,03 | 0,36 ± 0,04 | 0,0030  | ↑                          | 1a) |
| CXCR1 | 4   | -           | -           | -       | n.d.                       | 1b) |
| CXCR2 | 4   | -           | -           | -       | n.d.                       | 1b) |
| CXCR3 | 4   | 0,06 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,0002  | ↓                          | 1a) |
| CXCR4 | 4   | 0,06 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,6295  | n.s.                       | 1a) |

**Tabelle 3-2: Effekt der ConA-Stimulierung auf die Chemokinrezeptor-mRNA-Expression von Th1-Zellen.** Die Tabelle zeigt die statistische Auswertung der densitometrischen Daten von vier unabhängigen Array-Hybridisierungen für zehn Chemokinrezeptor-mRNAs (n= Anzahl der Experimente); <sup>1a)</sup> Präsenz durch 4 Experimente bestätigt; <sup>1b)</sup> Präsenz in keinem von 4 Experimenten nachweisbar; <sup>2)</sup> unterschiedliche Präsenz des Signals; n.s.: nicht signifikant; n.d.: nicht detektiert, ↑: signifikant heraufreguliert; ↓: signifikant herunterreguliert.

**Tabelle 3-2** fasst eine Serie von vier unabhängigen cDNA-Arrays zusammen und beschreibt statistisch signifikante Effekte der ConA-Stimulierung auf die für diese Arbeit interessantesten Chemokinrezeptoren.

Eine signifikante Reduktion der Expression von CCR2, CCR5 und CXCR3 und eine signifikante Steigerung der Expression von CCR4, CCR6 und CCR7 wurden in Ergänzung zur semi-quantitativen RT-PCR mit dieser Methode detektiert. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der RT-PCR ergab sich für CCR7 eine signifikante Induktion der mRNA-Expression durch ConA, während die Expression von CXCR3 deutlich reduziert wurde.

Signale für CCR3, CXCR1 und CXCR2 waren in keinem von vier durchgeführten Experimenten nachweisbar. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der RT-PCR wurde CCR3 als charakteristischer Rezeptor für Th2-Zellen im cDNA-Array nicht detektiert und unterstützt die Typisierung des IF12-Klons als Th1-Zellklon. CXCR1 und CXCR2 sind Rezeptoren für MIP-2 und GRO- $\alpha$  (human IL-8) und werden hauptsächlich auf Neutrophilen und CD8<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. Für CCR1 und CXCR4 konnte keine statistisch signifikante Herab- bzw. Heraufregulation nachgewiesen werden.

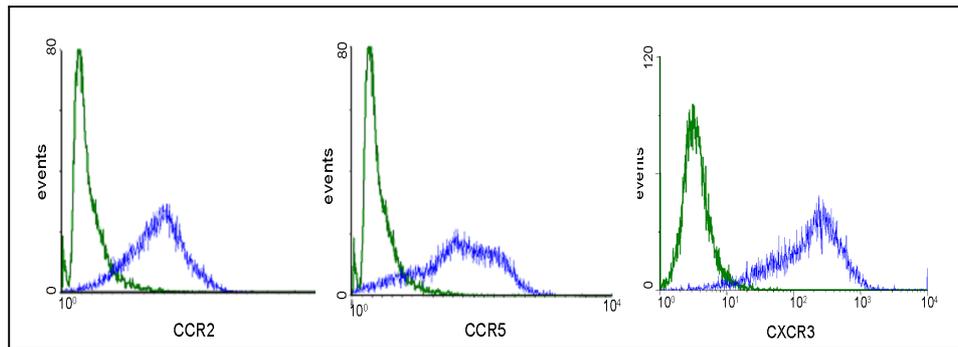
### 3.1.3 Expression von CCR2, CCR5 und CXCR3 auf Proteinebene

Nach der Charakterisierung der Chemokinrezeptoren des Th1IF12-Zellklons auf mRNA-Ebene, wurde als Grundlage für die nachfolgenden Antagonistenstudien die Expression von CCR2, CCR5 und CXCR3 auch auf Proteinebene untersucht.

Für den Nachweis von CCR2 und CCR5 auf der Oberfläche von Th1-Zellen wurden die unstimulierten Zellen mit spezifischen Antikörperüberständen der Hybridome, mMC-21 (CCR2) und mMC-68 (CCR5), die uns freundlicherweise von Herrn Dr. M. Mack (Innere Medizin, Klinik der LMU, Prof. D. Schlöndorff, München) zur Verfügung gestellt wurden, inkubiert.

Durch die Inkubation mit einem Biotin-markierten Sekundärantikörper, gefolgt von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin, wurden die Chemokinrezeptoren gefärbt und ihre Oberflächenexpression mittels FACS-Analyse quantitativ ausgewertet.

Einzelne FACS-Analysen sind in **Abbildung 3-3** exemplarisch als Histogramme für jeden Rezeptor dargestellt.



**Abb. 3-3: Bestimmung der Chemokinrezeptor-Proteinexpression des Th1-Klons durch FACS-Analyse.** Th1F12-Zellen wurden unter Normalbedingungen kultiviert (5ng/ml rhIL-2).  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz wurden wie in Methoden beschrieben behandelt. Nach Setzen des Gates auf lebende Lymphozyten wurde im FACS der Prozentsatz der CCR2, CCR5 und CXCR3 positiven Th1-Zellen (blau) gegenüber der Isotypkontrolle (grün) ermittelt.

Die Zusammenfassung der FACS-Analysen ergab für CCR2, CCR5 (n=4) und CXCR3 (n=7) eine durchschnittliche Rezeptorexpression von  $74,7 \pm 7,1\%$ ,  $69,1 \pm 19\%$  und  $74,7 \pm 5,1\%$ . Zur weiteren Charakterisierung der T-Helfer-1 Lymphozyten wurde in zwei Versuchen eine P- und E-Selektin-Expression von 45% bzw. 17,6% gemessen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend bestätigen diese Befunde nicht nur die zuvor einfach aufgrund des Zytokinprofils vorgenommene Klassifizierung des nephritogenen T-Lymphozytenklons als T-Helfer-1 Zelltyp (Radeke et al., 2002), sondern erweitern die Charakterisierung dieses für die nachfolgenden *in vitro*- und *in vivo*-Experimente verwendeten Zellklons in vielfacher Hinsicht. Die Definition der Th1-Ausrichtung sowie des zentralen Gedächtniszelltyps (*central memory Th1 cell*, Sallusto et al., 2001) wurde insbesondere durch die Chemokinrezeptor-Expression und -Regulation gemessen mittels RT-PCR, cDNA-Array und FACS-Analyse bestätigt. Als Modellzelle verantwortlich für die Progression von chronischen Entzündungen im Sinne einer Typ IV allergischen Reaktion (*delayed-type hypersensitivity, DTH*), weist dieser Th1-Klon alle wichtigen Chemokinrezeptoren, also CCR2, CCR5 und CXCR3 auf RNA- und Proteinebene auf. Die Stimulierung mit Concanavalin A, ein Modell der lokalen, MHC-abhängigen und antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen, führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression von CCR2, CCR5 und CXCR3, während zumindest auf mRNA-Ebene eine Erhöhung der Expression von CCR4, CCR6 und CCR7 zu beobachten war. Eine P-Selektin-Expression von 45% und eine geringe E-Selektin-Expression (17,6%) untermauerten den *central memory* Th1-Zelltyp.

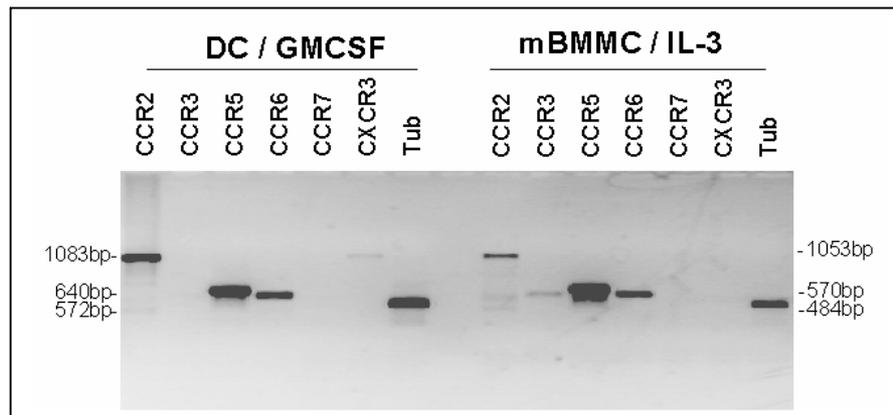
### 3.1.4 Chemokinrezeptorprofil von murinen XS52 und BMBCs

Ergänzend und zur Validierung der Th1F12-Chemokinrezeptor-Nachweise wurden weitere immunologisch relevante Zelltypen in Hinblick auf ihr Chemokin- und Chemokinrezeptorprofil

untersucht. Zu diesen gehören unreife Dendritische Zellen und die meist mit T-Helfer-2-Entzündungen verbundenen Mastzellen.

Die murine Dendritische Zelllinie XS52 (unreife Langerhans-Zellen der Haut) und die murinen Mastzellen (mBMMC: *murine Bone Marrow derived Mast Cells*) wurden unter Basalbedingungen (siehe Methoden) kultiviert, RNA isoliert und in der RT-PCR eingesetzt.

**Abbildung 3-4** zeigt das Ergebnis der RT-PCR mit spezifischen Primern für die Rezeptoren CCR2, CCR3, CCR5-7 und CXCR3.



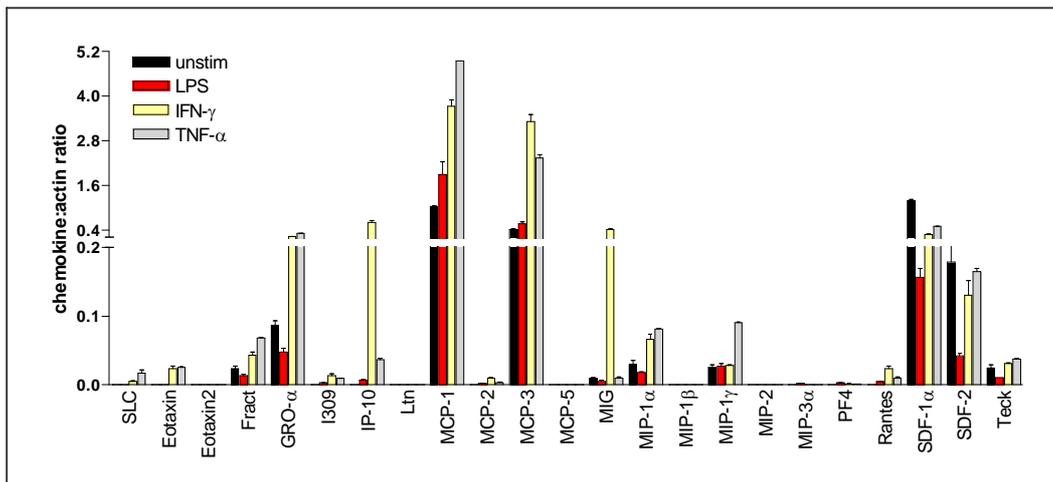
**Abb. 3-4: Chemokinrezeptorprofil der unreifen Langerhans-Zelllinie XS52 (links) und muriner Mastzellen (rechts).** XS52-Zellen wurden unter Normalbedingungen (5ng/ml GM-CSF) kultiviert, RNA isoliert und in der RT-PCR eingesetzt. Die murinen Mastzellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert (siehe Methoden), RNA isoliert und in der RT-PCR eingesetzt. CCR2 (1083bp); CCR3 (570bp); CCR5 (640bp); CCR6 (572bp); CCR7 (1086bp); CXCR3 (1053bp); Tub: Tubulin (484bp) als Positivkontrolle.

Das Ergebnis der RT-PCR zeigte für die XS52-Zellen eine starke konstitutive Expression der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5, CCR6 bei 35 PCR-Zyklen, sowie eine schwache Expression von CXCR3-mRNA. Die mRNA der Rezeptoren CCR3 und CCR7 war gar nicht detektierbar. Wie in der Diskussion ausgeführt, entsprechen diese Ergebnisse den Befunden aus der Literatur, nach denen unreife dendritische Zellen der Haut CCR6, jedoch kein CCR7 und CXCR3 und nur teilweise CCR3 exprimieren (s.u.). Als typische Vertreter einer Th2-gerichteten Immunantwort zeigten die murinen Mastzellen eine deutliche mRNA-Expression der Rezeptoren CCR2, CCR3, CCR5 und CCR6; CCR7 und CXCR3 hingegen wurden nicht exprimiert.

### 3.1.5 Chemokinprofil von murinen Mesangiumzellen

Wie in den Vorarbeiten des Labors gezeigt, ist ein Charakteristikum einer chronischen Entzündung auch die aktive Beteiligung der lokalen, organ-spezifischen Gewebezellen am Entzündungsprozess (Radeke et al., 2002). Als *in vitro*-Quelle für lokal freigesetzte Chemokine und damit als weiteres Testsystem für eine kombinatorische Antagonistengabe standen hierfür modellhaft murine glomeruläre Mesangiumzellen (Balb/c) zur Verfügung,

deren Expressionsprofil von Chemokinen zusätzlich untersucht wurde. Dazu wurden diese Zellen 24 Std. mit LPS (10µg/ml), murinem IFN- $\gamma$  (500U) und humanem TNF- $\alpha$  (500U) behandelt, anschließend RNA isoliert und in einem cDNA-Array für Chemokinliganden eingesetzt. Das Ergebnis des cDNA-Arrays (**Abb. 3-5**) zeigt die basale Expression unter *in vitro*- Kulturbedingungen sowie den Einfluss von LPS, mIFN- $\gamma$  und hTNF- $\alpha$  auf die Expression verschiedener Chemokin-mRNAs.



**Abb. 3-5: Einfluss von LPS, mIFN- $\gamma$  und hTNF- $\alpha$  auf die Chemokinexpression von murinen Mesangiumzellen ermittelt durch cDNA-Array.** Nach Isolation der RNA und Umschreibung in  $^{32}\text{P}$ -markierte cDNA-Sonden wurde die relative Expression mit gen-spezifischen cDNA-Fragmenten bestimmt. Densitometrisch ausgewertete Signale, die mit der cDNA von Kontrollzellen erzielt wurden, sind als schwarze Säulen dargestellt. Signale, die mit der cDNA von LPS-, IFN- $\gamma$ - oder TNF- $\alpha$ -stimulierten Zellen erhalten wurden, sind als rote, gelbe bzw. graue Säulen dargestellt. Die Werte zeigen die Ratio aus der Chemokin-cDNA und einer Aktin-Kontroll-cDNA. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines durchgeführten Experimentes.

Im Einklang mit früheren Befunden der Arbeitsgruppe in murinen aber auch humanen Nierenzellen zeigte das Ergebnis, dass von 23 prinzipiell durch den Array detektierbaren Chemokinen sechs Chemokine (Eotaxin2, Lymphotaktin (Ltn), MCP-5, MIP-1 $\beta$ , MIP-2 und MIP-3 $\alpha$ ) nicht von den murinen Mesangiumzellen exprimiert wurden. Unter *in vitro*-Kulturbedingungen wurde eine signifikante Basisexpression für MCP-1, MCP-3, SDF-1 $\alpha$  und SDF-2 nachgewiesen. Durch LPS-Stimulierung ließ sich die Expression inflammatorischer Chemokinen wie MCP-1 und MCP-3 leicht steigern, während sie zu einer Reduktion von SDF-1 $\alpha$  und SDF-2 führte. Die Stimulierung von IFN- $\gamma$  resultierte, wie erwartet, in eine stark erhöhte Expression der IFN- $\gamma$ -induzierten Chemokine (CXCR3-Liganden), wie IP-10 und MIG (I-TAC auf dem Array nicht vorhanden). Zusätzlich wurden durch IFN- $\gamma$  weitere Chemokine heraufreguliert (GRO- $\alpha$ , MCP-1, MCP-3), während z.B. SDF-1 $\alpha$  herunterreguliert wurde. Die Stimulierung durch TNF- $\alpha$  führte verglichen mit der Kontrolle zu einer erhöhten Expression von GRO- $\alpha$ , MCP-1, MCP-3 sowie MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\gamma$  in diesen Primärkulturen muriner glomerulärer Mesangiumzellen.

## 3.2. Generierung rekombinanter Chemokine und Chemokinrezeptor-Antagonisten in *Pichia pastoris*

### 3.2.1 Herstellung von murinem wtMCP-1 und MCP-1(1-8)del

Die primäre Klonierung von wtMCP-1 und MCP-1(1-8)del wurde in vorangegangener Arbeit zur Erlangung der Promotion von Dipl.-Biol. M. Wahl durchgeführt (siehe Dissertationen Medizinische Hochschule Hannover (MHH), 1998), ist im Folgenden aber noch einmal zusammengefasst, da die gewonnenen *P. pastoris*-Klone in der vorliegenden Arbeit erneut isoliert, sequenziert und zur Produktion der rekombinanten Chemokine verwendet wurden.

Die Herstellung von nativem MCP-1 und der N-terminal deletierten Form von MCP-1, MCP-1(1-8)del, erfolgte durch eine RT-PCR mit den Mutationsprimern mMCP-1/JE\_ sekS und mMCP\_1/JE\_AS bzw. mMCP-1/JE2\_S1 und mMCP-1/JE\_AS mit RNA aus EL-4c Thymomazellen der Maus. Aus einer *site-directed* Mutagenese-Reaktion ergab sich für MCP-1 ein Fragment mit nativer Signalsequenz. Bei der Herstellung von MCP-1(1-8)del wurden die ersten acht N-terminalen Aminosäuren durch Verwendung von bestimmten Selektions-Primern in einer RT-PCR deletiert. Anschließend wurden die cDNAs unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Sna*BI/*Eco*RI in den *Pichia pastoris* Expressionsvektor pPIC9 kloniert und ergaben für wtMCP-1 eine cDNA von 474bp Länge, einschließlich der nativen Signalsequenz von MCP-1, während sich für MCP-1(1-8)del eine cDNA in 450bp Länge ergab, einschließlich des  $\alpha$ -Faktor-Signalpeptids des *Pichia*-Vektors (aus *S.cerevisiae*, siehe *Pichia*-Expressionsprotokoll).

Die Plasmide wurden durch Hitzeschock-Behandlung in *E.coli* transformiert, amplifiziert und schließlich durch Plasmidisolierung aufgereinigt. Die Integration der cDNA in den pPIC9 Vektor wurde mittels PCR/Restriktion verifiziert. Die Muteinsequenz-enthaltenden Plasmide wurden mittels Restriktion mit *Bst*I1071 linearisiert, und die Transformation in *Pichia pastoris* erfolgte mittels Lithium-Chlorid-Methode. Die Integration der Konstrukte durch homologe Rekombination in das *Pichia*-Genom wurde durch eine PCR mit den AOX1-Primern kontrolliert.

Nach einer zusätzlichen cDNA-Sequenzierung der Klone wurde Klon 1 für die Expression von Wildtyp-MCP-1 (wtMCP-1) und Klon 5 für die Expression von MCP-1(1-8)del verwendet.

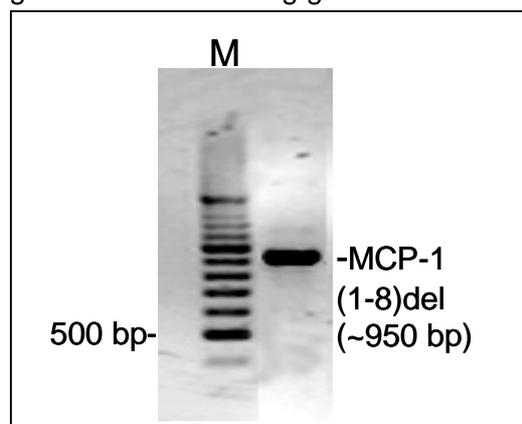
### Phänotypische Charakterisierung von MCP-1(1-8)del-Klon 5

Die Herstellung und Expression nach dem *Pichia*-Expression Kit-Protokoll (Invitrogen) erlaubt die Generierung zweier verschiedener Phänotypen an *Pichia*-Stämmen: Mut<sup>+</sup> und Mut<sup>S</sup>. In *Pichia pastoris* kodieren die Gene AOX1 (*alcohol oxidase*) und AOX2 für das Protein

Alkoholoxidase. Das Produkt des *AOX1* Gens ist überwiegend verantwortlich für die Alkoholoxidase-Aktivität in intakten Zellen. Die Expression und eine hohe Aktivität des *AOX1*-Gens werden durch Umstellung von Glycerin auf Methanol induziert und der *AOX1*-Promotor wird in diesem System benutzt, um die Expression des Zielgens zu initiieren. Obwohl *AOX2* und *AOX1* zu 97% homolog sind, ist das Wachstum der *Mut<sup>S</sup>*-Hefestämme, die nur *AOX2* besitzen, viel langsamer. *Mut<sup>S</sup>* steht für *methanol utilization slow* und bezeichnet den Phänotyp, der aufgrund des Verlustes des *AOX1*-Gens nur eine verminderte Alkoholoxidase-Aktivität aufweist.

Für die Expression der Chemokine und Muteine durch Schüttelkolben-Kultivierung, aber auch für die Anwendung der Hochzelldichte-Kultivierung wurde als Ziel der *Mut<sup>S</sup>*-Phänotyp favorisiert. Dadurch sollte eine reine Wachstumsphase der Hefe auf Glycerol und eine reine Produktionsphase an gewünschtem Zielprotein in der Induktionsphase mit Methanol gesichert werden.

Die Untersuchung des Phänotyps ergab für das bereits vorhandene MCP-1(1-8)del den gewünschten *Mut<sup>S</sup>*-Stamm. **Abbildung 3-6** zeigt das Ergebnis der AOX-PCR für MCP-1(1-8)del mit einer Fragmentgröße von 950bp. Die fehlende Bande bei 2,2kb charakterisiert den *Mut<sup>S</sup>*-Typ. Für wtMCP-1 ergab die Untersuchung gleichfalls den *Mut<sup>S</sup>*-Phänotyp.



**Abb.: 3-6: Phänotypische Bestimmung von MCP-1(1-8)del mittels AOX-PCR.** Eine PCR mit 3' und 5' AOX-Primern wurde durchgeführt, auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht. M: 100bp DNA-Größenstandard; MCP-1(1-8)del (950bp).

### 3.2.2 Herstellung von viralem MIP-II

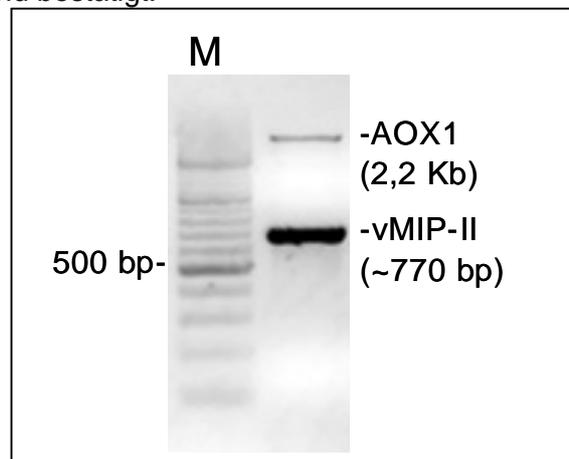
Die Klonierung von vMIP-II wurde von Frau Dr. P. Marchand 1999 in Hannover durchgeführt und wird in dieser Arbeit nicht mehr im Detail behandelt. Der vMIP-II-Klon Nummer 7 wurde in der vorliegenden Arbeit auf seine Expressionseigenschaften hin untersucht und zur Produktion des rekombinanten Chemokins verwendet.

Die Herstellung der cDNA von viralem MIP-II erfolgte durch eine PCR mit den Primern vMIP-II\_fw und vMIP-II\_rev (siehe Methoden) von dem Plasmid pTEJ8, das uns freundlicher Weise von Dr. Kledal (Institut für Molekulare Pharmakologie, Panum Institut, Kopenhagen,

Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde. Das damit amplifizierte Fragment (279bp) wurde mittels *XhoI/EcoRI* in den Expressionsvektor pPIC9 kloniert und ergab das Fusionsplasmid  $\alpha$ F-vMIP-II. Die cDNA-Sequenzierung ergab die korrekte Sequenz von vMIP-II entsprechend der Gen-Datenbank.

### Phänotyp-Bestimmung des vMIP-II-produzierenden *P. pastoris*-Klons

Die Überprüfung des Phänotyps ergab für vMIP-II nicht den gewünschten Mut<sup>S</sup>-Stamm, sondern Mut<sup>+</sup>- (*AOX1*-positiven) Typ (**Abb.: 3-7**). Es zeigte sich zusätzlich zu dem erwarteten Fragment bei 771bp (492bp *AOX*-PCR-Fragment ohne Insert plus 279bp vMIP-II-cDNA) die *AOX1*-Genbande bei 2,2kb. Für vMIP-II wurde daher ein verändertes Kultivierungsverhalten in der Hochzell-dichte-Kultivierung erwartet (siehe Masterarbeit Dipl.-Ing. E. Werner, 2002) und bestätigt.



**Abb.: 3-7: Phänotypische Bestimmung des vMIP-II-produzierenden *P. pastoris*-Klons mittels AOX-PCR.** DNA wurde isoliert und in einer PCR mit *AOX*-Primern eingesetzt. Der Ansatz wurde im Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr angefärbt. Charakteristisch für den Mut<sup>+</sup>-Typ zeigt sich zusätzlich zur vMIP-II-Bande bei 771bp eine Bande bei 2,2kb, die dem *AOX1*-Genfragment entspricht. M: 100bp DNA-Größenstandard.

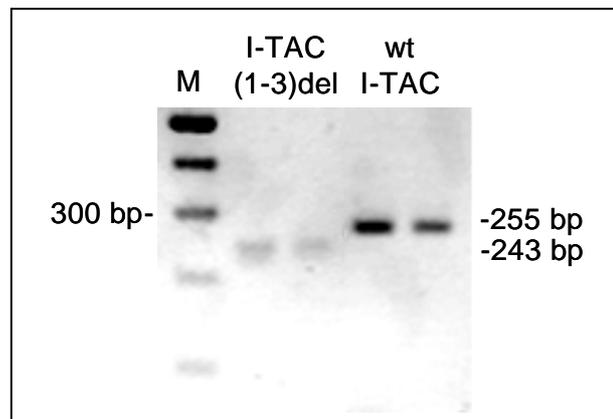
### 3.2.3 Herstellung von wtl-TAC und I-TAC(1-3)del

Die primäre Klonierung von wtl-TAC und I-TAC(1-3)del in pPIC9K wurde von Frau Dipl.-Ing. E. Werner im Rahmen ihrer Masterarbeit mit Hilfestellung durchgeführt. Sie wird nachfolgend beispielhaft für die oben genannten rekombinanten Chemokine und Antagonisten nochmals detailliert beschrieben. Die nachfolgende Selektion der positiven Klone von I-TAC(1-3)del, sowie die Kultivierung, Expression und nachfolgende Charakterisierung von wtl-TAC und I-TAC(1-3)del sind wiederum Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

### Herstellung der I-TAC-cDNA-Konstrukte

Natives I-TAC und I-TAC(1-3)del wurden ohne ihr eigenes Signalpeptid von dem Vektor pMT/V5-HisBmCXCL11, der uns freundlicherweise von Prof. Dr. Gabriele Werner-Felmayer (Institut für Medizinische Chemie und Biochemie, Universität Innsbruck, Österreich) zur Verfügung gestellt wurde, als Template in einer PCR mit korrekturlesefähiger *Pfx*-Polymerase amplifiziert. Das native I-TAC wurde mit Hilfe der spezifischen Primer wtl-TAC\_fw und wtl-TAC\_rev (siehe Methoden) in der Länge von 255bp hergestellt.

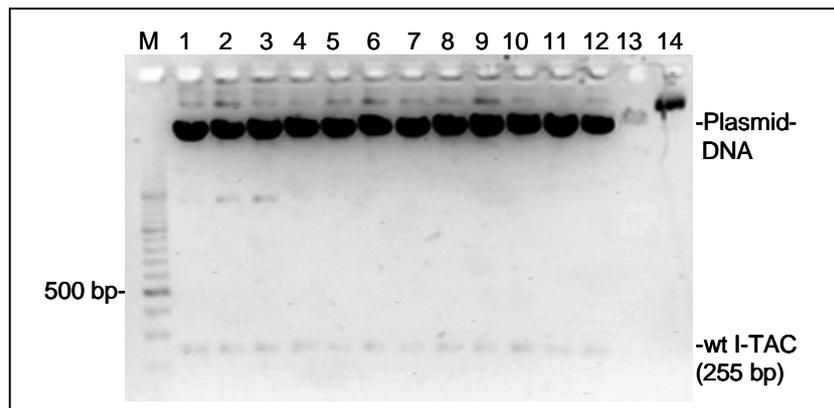
Das um drei Aminosäuren verkürzte I-TAC(1-3)del mit einer Länge von 243bp wurde mit einem vier Aminosäuren deletierenden Primer I-TAC(1-3)del\_fw und wt-I-TAC\_rev (siehe Methoden) in einer PCR hergestellt. Durch das Verbleiben von drei Basenpaaren von der *EcoRI*-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors wurden mit diesem Primer dann folgerichtig I-TAC(1-3)del hergestellt, was durch anschließende cDNA-Sequenzierung bestätigt wurde. Beide Ansätze wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (**Abb.: 3-8**).



**Abb.: 3-8: Generierung von wtl-TAC und I-TAC(1-3)del-cDNA mittels *Pfx*-PCR und den jeweils spezifischen I-TAC-Primern.** Fragmentgrößen im Agarosegel: wtl-TAC (255bp); I-TAC(1-3)del (243bp); M: 100bp DNA-Größenstandard

Anschließend wurde der *Pichia*-Expressionsvektor pPIC9K durch Restriktion mit *EcoRI* und *NotI* geschnitten, jeweils mit den cDNAs für wtl-TAC und I-TAC(1-3)del ligiert und durch die Hitzeschock-Methode in *E.coli* transformiert. Die Selektion der *E.coli*-Klone, die das Plasmid aufgenommen hatten, erfolgte durch Ampicillin-haltige LB-Platten.

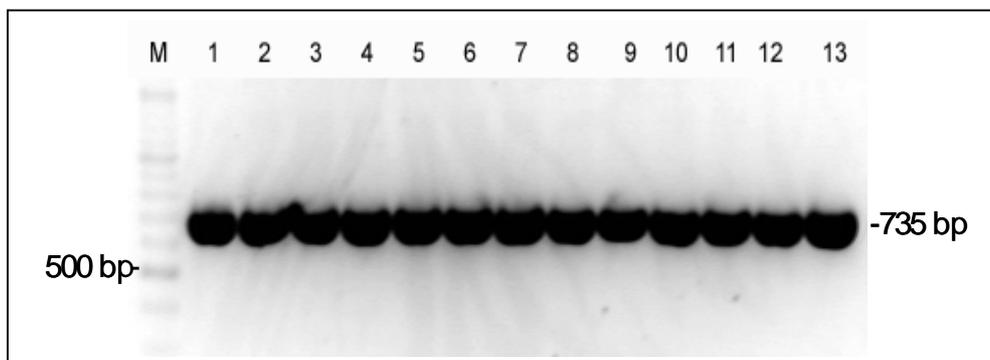
Zum spezifischen Nachweis der Integration der wtl-TAC-cDNA in das Plasmid erfolgte eine Isolierung der Plasmid-DNA mittels Miniprep-Methode und anschließender Restriktion. Dazu wurde das isolierte Konstrukt mit *EcoRI* und *NotI* geschnitten und der Ansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. **Abbildung 3-9** zeigt den Verdau von zwölf gepickten wtl-TAC-Klonen mit spezifischem wtl-TAC-Fragment (255bp).



**Abb. 3-9: Konstrukt wtI-TAC in pPIC9K (*EcoRI/NotI*-geschnitten).** Reihen 1-12 zeigen die gepickten *E.coli*-Klone mit wtI-TAC-Insert. Reihe 13 zeigt das verdaute Plasmid ohne I-TAC-Insert. Reihe 14 repräsentiert das ungeschnittene Plasmid. M: 100bp DNA-Größenstandard

Für einen schnelleren und ebenfalls definitiven Nachweis von I-TAC(1-3)del wurde eine PCR mit AOX-Primern durchgeführt. Dazu wurden die 13 gepickten *E.coli*-Klone in einer PCR als Template eingesetzt und die PCR-Ansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt.

**Abbildung 3-10** zeigt den spezifischen Nachweis der I-TAC(1-3)del-cDNA (735bp), dessen Basenpaarlänge sich aus dem PCR-Produkt für den pPIC9K-Vektor ohne Insert (492bp) und dem Fragment für I-TAC(1-3)del (243bp) zusammensetzt. Die Plasmid-DNA jedes positiven Klons wurde mittels Miniprep isoliert und anschließend sequenziert.

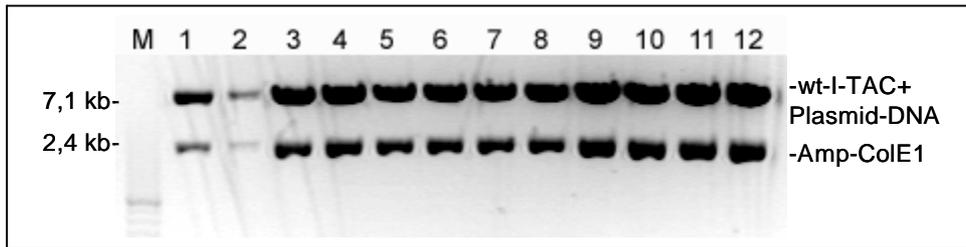


**Abb. 3-10: Konstrukt I-TAC(1-3)del in pPIC9K (PCR mit AOX-Primern).** Reihen 1-13 zeigen die gepickten *E.coli*-Klone. M: 100bp DNA-Größenstandard

### Transduktion von *Pichia pastoris*

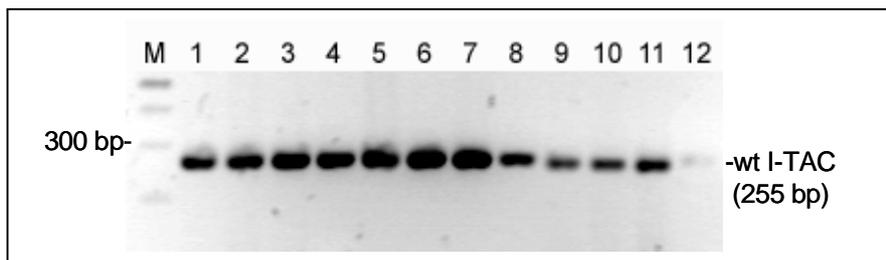
Die Transduktion von *P. pastoris* mit den verschiedenen I-TAC-Plasmiden wurde mittels Lithiumchlorid-Methode durchgeführt. Dazu wurde die aufgereinigten, sequenzkontrollierten Plasmide mit dem Restriktionsenzym *BglII* linearisiert und geschnitten, was einerseits die Ausbildung des gewünschten Mut<sup>S</sup>-Phänotyps begünstigt und andererseits die nur für die Transformation in *E.coli* wichtigen Ampicillin- und andere *E.coli*-Gene im Rahmen der homologen Rekombination in das *Pichia*-Genom zurück lässt. Die gereinigten cDNAs

wurden mit einer T4-Ligase über Nacht verbunden und mittels Lithiumchlorid-Methode in *Pichia pastoris* eingebracht.



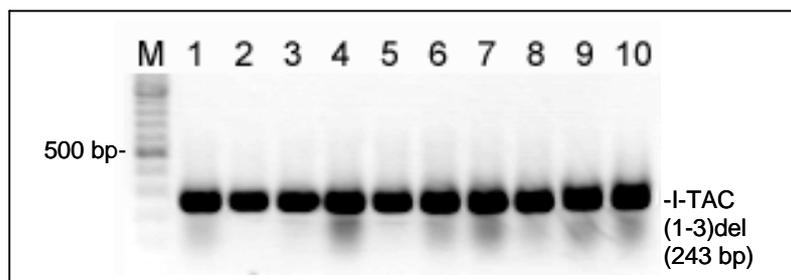
**Abb. 3-11: BglII-Restriktion.** Die Fragmentgröße für die wtI-TAC-Plasmid-DNA beträgt 7,1kb. Das Fragment des Ampicillin-ColE-Gens beträgt 2,4kb. M: 100bp-DNA-Größenstandard, Reihe 1-12: geschnittene wtI-TAC-Plasmide.

Die Selektion der positiven Klone erfolgte auf MD-Platten ohne Histidin, so dass nur Klone, die das Plasmid mit dem His4-Gen aufgenommen hatten, auf diesen Platten zu wachsen vermochten. **Abbildung 3-12** zeigt das Ergebnis der Integration von wtI-TAC-cDNA in das *Pichia*-Genom. 11 der 12 gepickten *Pichia*-Klone hatten die wtI-TAC-cDNA in das Genom integriert.



**Abb. 3-12: wtI-TAC-PCR mit spezifischen I-TAC-Primern.** Reihe 1-11: *Pichia*-Klone mit integrierter wtI-TAC-cDNA (255bp); Reihe 12: Klon ohne wtI-TAC-cDNA; M: 100bp DNA-Größenstandard

Der Nachweis der Integration der I-TAC(1-3)del-cDNA in das *Pichia*-Genom erfolgte durch eine PCR mit I-TAC(1-3)del-Primern. Dazu wurde die DNA von zehn *Pichia*-Klonen verwendet. **Abbildung 3-13** zeigt das Ergebnis der PCR von zehn gepickten Klonen, die eine Fragmentgröße von 243bp aufweisen.



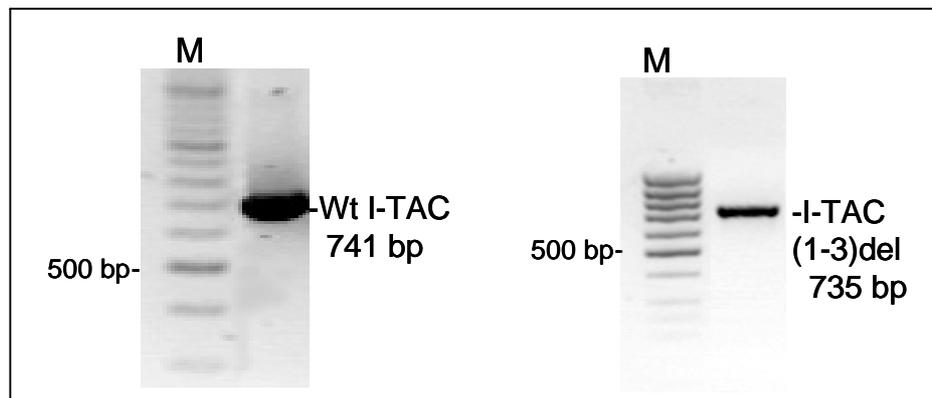
**Abb. 3-13: PCR mit I-TAC(1-3)del-Primern.** Reihe 1-10: *Pichia*-Klone mit integriertem I-TAC(1-3)del (243bp). M: 100bp DNA-Größenmarker

Alle zehn generierten Klone wiesen die Integration von I-TAC(1-3)del in das *Pichia*-Genom auf und konnten für die Expressionsanalyse verwendet werden. Mittels ELISA wurde anschließend der Klon ermittelt, der die höchste Menge an I-TAC(1-3)del exprimiert. Für die nachfolgende Expression von I-TAC(1-3)del wurde Klon 8 verwendet.

### Phänotypische Bestimmung von wtI-TAC und I-TAC(1-3)del

Um das Kultivierungs- und Wachstumsverhalten der generierten Klone zu überprüfen, wurde für wtI-TAC und I-TAC(1-3)del, wie bereits für die zuvor beschriebenen Muteine, eine phänotypische Untersuchung mittels AOX-PCR durchgeführt. Dazu wurde wie bereits beschrieben verfahren.

Das Ergebnis dieser Analyse ist in **Abbildung 3-14** dargestellt und zeigt für das jeweilige Protein nur eine größenspezifische Bande, welche für den auf Methanol langsam wachsenden Mut<sup>S</sup>-Phänotyp spricht.



**Abb. 3-14:** Phänotypische Untersuchung von wtI-TAC und I-TAC(1-3)del mittels AOX-PCR. Rechts: Mut<sup>S</sup>-Phänotyp detektiert durch eine spezifische Bande für wtI-TAC bei 741bp. Links: Mut<sup>S</sup>-Phänotyp detektiert durch eine spezifische Bande für I-TAC(1-3)del bei 735bp. M: 100bp-Größenstandard.

### 3.2.4 Sequenzierung der Antagonisten-cDNAs

Die cDNA-Sequenzierung für MCP-1(1-8)del und vMIP-II erfolgte nachträglich durch Isolierung von DNA aus den für die Expression verwendeten *Pichia*-Klonen Nr. 5 bzw. 7. Dazu wurde eine PCR mit der *Pfx*-Polymerase und den 3'AOX- und 5'αF- Primern durchgeführt. **Abbildungen 3-15** und **3-16** zeigen die Sequenzvergleiche der eigenen Ergebnisse mit den in NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) publizierten Sequenzen.

```

41  ctcacctgctgctactcattcaccagcaanatgatcccaatgattaggctggaganctac 100
   |||
182  ctcacctgctgctactcattcaccagcaagatgatcccaatgagtaggctggagagctac 241
32  L T C C Y S F T S K M I P M S R L E S Y

101  aaganngatcaccagcagcaggtgtcccaaagaagctgtagtttttgtcaccaagctcaa 160
   |||
242  aagag-gatcaccagcagcaggtgtcccaaagaagctgtagtttttgtcaccaagctcaa 300
52  K R I T S S R C P K E A V V F V T K L K

161  gagagaggtctgtgctgaccccaaganggaatgggtccaggacatacattaaaaacctgg 220
   |||
301  gagagaggtctgtgctgaccccaaganggaatgggtccag-acatacattaaaaacctgg 359
72  R E V C A D P K K E W V Q T Y I K N L

221  gatcggaaccaaatgagatcaggaacctacaactttattttaaactgcatctgccctaag 280
   |||
360  -atcggaaccaaatgagatcag-aacctacaactttattttaaactgcatctgccctaag 417
91  D R N Q M R S E P T T L F K T A S A L R

```

**Abb. 3-15: *P. pastoris*-Klon Nr. 5: 3' MCP-1(1-8)del-Sequenzanalyse mit BLAST.** Erste Reihe: Nukleotidsequenz des *Pichia*-Klons, zweite Reihe: Publierte Referenzsequenz GI:6755429. Homologe Nukleotide sind mit einer Linie dargestellt, während nicht übereinstimmende Nukleotide eine Lücke vorweisen. Die letzte Reihe repräsentiert die Aminosäuresequenz mittels Kurzkodierung.

```

41  ctgggagcgtcctggcatagaccggacaagtgtgtctcggttaccagaaaagaccatta 100
   |||
21710 ctgggagcgtcctggcatagaccggacaagtgtgtctcggttaccagaaaagaccatta 21651
24  L G A S W H R P D K C C L G Y Q K R P L

101  ccacaggtgcttctgtccagctggtacccc-cctcccaactgtgcagcaagccgggtgtg 159
   |||
21650 ccacaggtgcttctgtccagctggtaccccacctcccaactgtgcagcaagccgggtgtg 21591
44  P Q V L L S S W Y P T S Q L C S K P G V

160  atatTTTTgacaaagcgtggtcngccaggtgtgtgccngacaaatcgaaagactgggtga 219
   |||
21590 atatTTTTgacaaagcgtggtc-gccaggtgtgtgcc-gacaaatcgaaagactgggtga 21533
64  I F L T K R G R Q V C A D K S K D W V

```

**Abb. 3-16: *P. pastoris*-Klon Nr. 7: 3' vMIP-II-Sequenzanalyse mit BLAST.** Erste Reihe: Nukleotidsequenz des *Pichia*-Klons, zweite Reihe: Publierte Referenzsequenz GI:14627174. Homologe Nukleotide sind mit einer Linie dargestellt, während nicht übereinstimmende Nukleotide eine Lücke vorweisen. Die letzte Reihe repräsentiert die Aminosäuresequenz mittels Kurzkodierung.

Das Ergebnis der Sequenzierung zeigt, dass die Sequenzen von MCP-1(1-8)del und vMIP-II der gezeigten Referenzsequenz der NCBI entsprechen. Dargestellt ist die cDNA- bzw. Proteinsequenz ohne natürliches Signalpeptid des jeweiligen Muteins. Die Sequenzierung von wtI-TAC und I-TAC(1-3)del erfolgte vor der Transduktion in *Pichia pastoris* mittels PCR und den 3'AOX- und 5'AOX-Primern. **Abbildungen 3-17** und **3-18** zeigen die Sequenzierungs-Ergebnisse dazu.



Das Ergebnis der I-TAC-Sequenzierung zeigt, dass die Herstellung der Deletionsmutante I-TAC(1-3)del (Deletion von F-L-M-...) durch Verwendung von I-TAC(1-3)del-Primern zum korrekten Mutein führten. Das Phenylalanin (F) aus der multiplen Klonierungsstelle blieb erhalten und resultierte in I-TAC(1-3)del.

### 3.3 Expression der Muteine in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*

#### 3.3.1 Schüttelkolben-Kultivierung

Die Expression der Chemokine/Muteine durch *P. pastoris* erfolgte im kleinen Maßstab in 500ml-Kolben im Inkubator bei 30°C. Dazu wurden die positiven Klone in Glycerin-haltiges Minimalmedium (BMG-Medium) überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2-6 kultiviert, die einer Zelldichte von etwa 1-3x 10<sup>8</sup> Zellen/ml entspricht. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 1/10 Volumen BMM-Medium aufgenommen, um mit der Umstellung auf das Substrat Methanol den AOX-Promotor zu aktivieren und die Expression des gewünschten Chemokins/Muteins in möglichst hoher Dichte zu initiieren. Um verbrauchtes Methanol zu ersetzen und die Proteinexpression zu erhalten, wurden der *Pichia*-Kultur alle 24 Stunden final 5% (v/v) Methanol zugesetzt. Es zeigte sich, dass die Proteinkonzentrationen der 24 und 48 Stunden Induktion höher lagen als nach 72 Stunden, so dass die Expression auf diese zwei Induktionszeitpunkte beschränkt wurde. Die Gesamtproteinkonzentration an Chemokin/Mutein variierte zwischen 8-25µg/ml Überstand. Zur Aufkonzentrierung des *Pichia*-Überstandes wurden Konzentratoren mit einem MWCO (*Molecular weight cut off*: Größenausschluss) von 100kDa und 3kDa verwendet, wodurch sich die Gesamtkonzentration noch steigern ließ. Der unkonzentrierte und konzentrierte *Pichia*-Überstand wurde für Western Blot-Analysen verwendet, um die Expression der Chemokine/Muteine durch *Pichia* zu analysieren und zu kontrollieren.

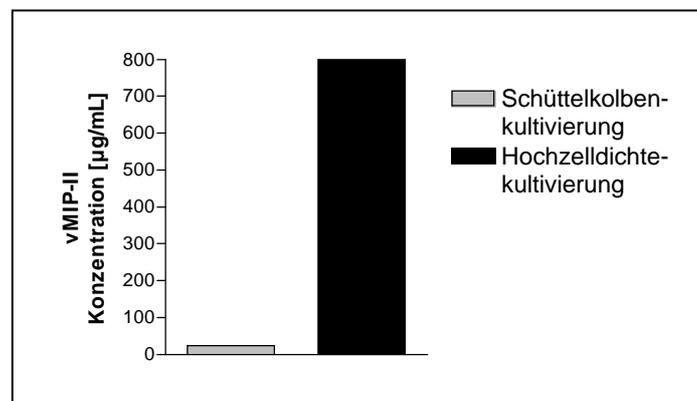
Die Kultivierung von 28 Litern I-TAC(1-3)del in 10L-Kolben wurde in dieser Arbeit durch die Kooperation mit Dr. Chr. Reinhardt (Max-Planck-Institut (MPI) für Biophysik, Frankfurt) ermöglicht, in dessen Labor ebenso mit *Pichia pastoris* als Expressionssystem gearbeitet wird, und dass über größere Schüttelinkubatoren verfügt.

Von den verschiedenen *Pichia*-Klonen (wtMCP-1: Klon 1, MCP-1(1-8)del: Klon 5, vMIP-II: Klon 7, wtI-TAC: Klon 11, I-TAC(1-3)del: Klon 8) mit dem jeweils gewünschten Chemokin/Mutein wurden Cryo-Reserven angelegt. Dazu wurden Zellen aus der dichten

BMG-Kultur entnommen und mit 10% Glycerin bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Diese Klone wurden gleichfalls für die Durchführung der Hochzelldichte-Kultivierung nach Hamburg (AG Prof. Dr. R. Luttmann, Hochschule für Angewandte Wissenschaft, FH Hamburg) versendet.

### 3.3.2 Hochzelldichte-Kultivierung

Die Hochzelldichte-Kultivierung ermöglicht eine deutlich gesteigerte Proteinexpression durch eine automatisierte *Pichia pastoris*-Kultivierung in einem 10L-Bioreaktor. Eine computergesteuerte und -überwachte Zufuhr von Nährstoffen, eine kontinuierliche Methanolzufuhr und ein gleichzeitiger Abfluss von Abfallstoffen, sowie ein stetiges Abnehmen des Produkts, sorgen für optimierte Kultivierungsbedingungen und eine Proteinausbeute von bis zu  $600\mu\text{g/ml}$  Kulturüberstand. Die Kultivierung von MCP-1(1-8)<sub>del</sub>, vMIP-II und I-TAC(1-3)<sub>del</sub> wurde in Hamburg von Frau Dipl.-Ing. Gesine Cornelissen und anschließend von Frau Dipl.-Ing. Elisabeth Werner durchgeführt. Diese optimierte Kultivierungstechnik wurde von Frau E. Werner in Ihrer Masterarbeit detailliert beschrieben und publiziert (siehe Master-Arbeit Werner und Cornelissen et al., 2003). **Abbildung 3-19** zeigt repräsentativ für alle Muteine die Proteinausbeuten für vMIP-II, die zum einen durch Schüttelkolben-Kultivierung und zum anderen durch Hochzelldichte-Kultivierung aus Hamburg erhalten wurden.



**Abb. 3-19: Vergleich der Expressions-Ausbeute an vMIP-II, gewonnen durch Schüttelkolben-Kultivierung und Hochzelldichte-Kultivierung.** Die in den *Pichia*-Überständen enthaltene Proteinmengen an vMIP-II wurden mit einem spezifischen vMIP-II-ELISA nachgewiesen (siehe Methoden). Durch die Expression mittels Hochzelldichte-Kultivierung konnten bis zu 30-fach höhere vMIP-II Konzentrationen erreicht werden.

### 3.3.3 Western-Blot-Analyse der generierten Muteine

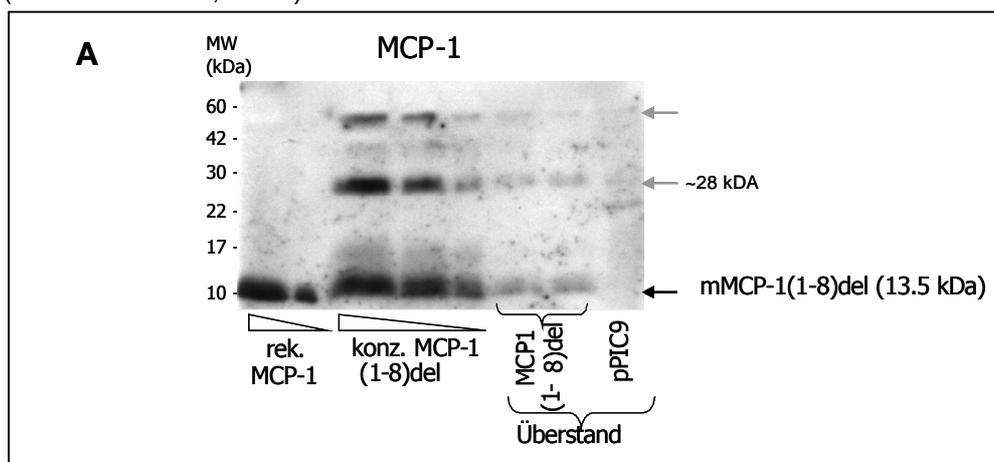
Der Muteingehalt im *Pichia*-Überstand wurde als Äquivalent gegenüber einem rekombinanten Standard (käufliches, *E.coli*-exprimiertes Chemokin) mittels spezifischem ELISA für jedes Mutein bestimmt; anschließend wurde die Immunreaktivität und das Molekulargewicht in Western-Blots untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen

von aufkonzentriertem und unkonzentriertem Muein in einem 12,5%- oder 15%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert.

**Abbildungen 3-20A, B und C** zeigen die Western-Blot-Analysen für MCP-1(1-8)del (A), vMIP-II (B) und I-TAC(1-3)del (C). Als Positivkontrolle diente in allen Versuchen das kommerziell erhältliche *E.coli*-exprimierte native Chemokin, während als Negativkontrolle Leervektor-Überstand eingesetzt wurde.

### Western-Blot-Analyse von MCP-1(1-8)del

Die Western-Blot-Analyse von MCP-1(1-8)del zeigt drei prominente Banden. Die niedrigste Bande bei 13-14kDa, welche sich auf etwa gleicher Höhe mit der Positivkontrolle mMCP-1 befindet, lässt auf das Monomer von MCP-1(1-8)del (13,5kDa) schließen. Die zweite Bande bei etwa 30kDa und die dritte Bande bei etwa 60kDa scheinen für eine Multimerbildung zu sprechen und stellen sehr wahrscheinlich das Dimer sowie Tetramer von MCP-1(1-8)del dar. Weiterhin ist eine schwächere Bande bei etwa 45kDa zu sehen, die einem Trimer von MCP-1(1-8)del entsprechen könnte. Die Bildung von Oligomeren wurde z.B. für Chemokine wie MCP-1/CCL2 und RANTES/CCL5 beschrieben und scheint z. T. wichtig für deren Bioaktivität zu sein (Proudfoot et al., 2003).



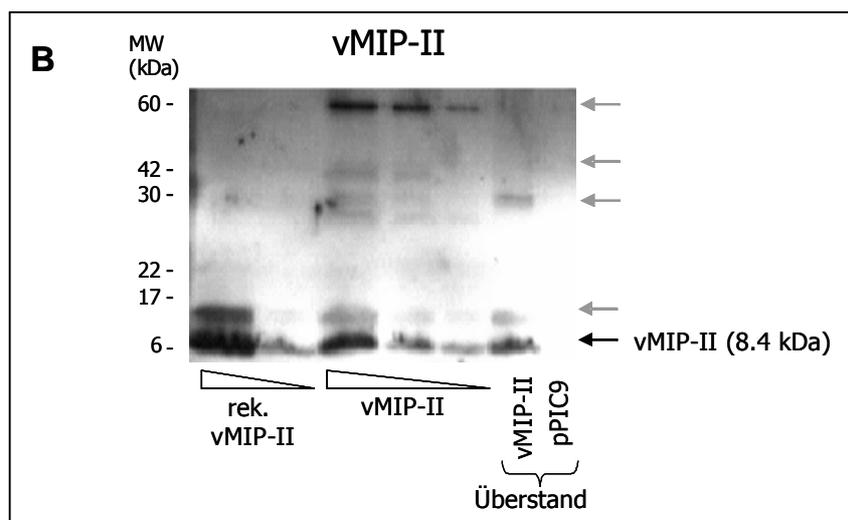
**Abb. 3-20A: Western-Blot-Analyse von MCP-1(1-8)del.** MCP-1(1-8)del-haltiger *Pichia*-Überstand (1, 2,5, und 5µg MCP-1) wurde in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, anschließend geblottet und mit spezifischem anti-MCP-1-Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle wurden 200ng und 20ng rekombinantes MCP-1 (R&D Systems) verwendet. Als Negativkontrolle diente 1µg Leervektor.

Posttranslationale Modifikationen, wie N- oder O-Glykosylierungen, die durch Expression in eukaryotischen Organismen entstehen, können zur Abweichung vom exakten Molekulargewicht eines nativen Proteins beitragen (Daly, 2004). Die Durchführung eines Glykosidase-F-Verdau, durch den potentielle N-Glykosylierungsstellen von MCP-1(1-8)del ermittelt werden sollten, fiel negativ aus (nicht gezeigte Daten) und deckte sich mit der theoretischen Untersuchung der online verfügbaren Proteindatenbank Swiss-Prot ([www.ExPASy.org](http://www.ExPASy.org)), nach der MCP-1(1-8)del nur eine endständige N-Glykosylierungsstelle sowie zwei O-Glykosylierungsstellen besitzt. Die Wahrscheinlichkeit einer Glykosylierung am

Protein-Ende wurde on Swiss-Prot als gering eingeschätzt. Die O-Glykosylierungen wurden nicht untersucht.

### Western-Blot-Analyse von viralem MIP-II

Der Western-Blot von vMIP-II zeigte eine deutliche Bande bei etwa 8kDa und eine zweite etwas höher gelegene Bande bei etwa 16kDa. Im Vergleich mit dem rekombinanten vMIP-II von R&D Systems zeigt sich, dass diese beiden Banden ebenso bei *E.coli*-exprimiertem vMIP-II detektiert wurden. Dies ließ darauf schließen, dass es sich bei der unteren Bande um das Monomer von vMIP-II (8,4kDa) und bei der etwas höher gelegenen Bande wahrscheinlich um ein Dimer von vMIP-II handelte. Weiterhin konnten Signale bei 30kDa, über 45kDa und etwa 60kDa detektiert werden. Ein durchgeführter Glykosidase-F-Verdau konnte keine N-Glykosylierung detektieren (Daten nicht gezeigt) und deckte sich mit den anschließend durchgeführten theoretischen Untersuchungen mit SwissProt, nach der vMIP-II keine N-Glykosylierungsstellen aufweist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den höhermolekularen Banden um Multimere von vMIP-II handelt.



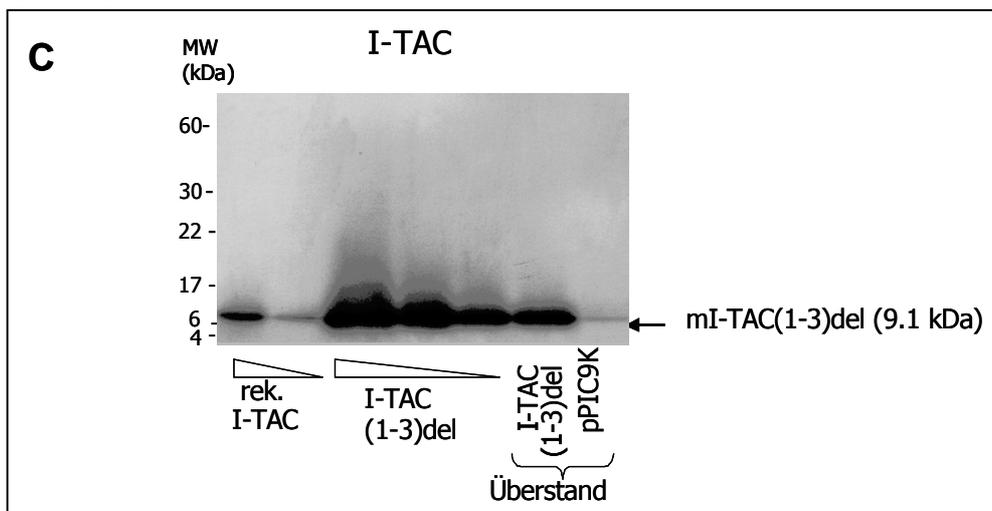
**Abb. 3-20B: Western-Blot-Analyse zu vMIP-II.** VMIP-II-haltiger *Pichia*-Überstand (1, 2,5 und 5µg vMIP-II) wurde in einem 12,5% Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit einem spezifischen Anti-vMIP-II Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle wurden 200ng und 20ng rekombinantes vMIP-II verwendet. Als Negativkontrolle diente 1µg Leervektor. M: Proteingrößen-Standard (Invitrogen).

Es zeigte sich zudem, dass durch die Expression in *Pichia* eine Multimerbildung von vMIP-II zu beobachten war, nachdem O-Glykosylierungen ausgeschlossen werden konnten. Wie in der Diskussion ausgeführt, ist die Quartärstruktur von vMIP-II noch ungeklärt (Fernandez et al., 2000).

Die Analyse von vMIP-II zeigte, dass die Expression durch *Pichia pastoris* ein hinsichtlich des Molekulargewichts korrektes Protein ergab, dessen Immunreaktivität durch einen spezifischen Anti-vMIP-II Ak bestätigt werden konnte.

### Western-Blot-Analyse von I-TAC(1-3)del

Im nächsten Schritt wurde die Expression von I-TAC(1-3)del mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die spezifische Detektion zeigte eine prominente Bande bei einer Größe von etwa 9kDa. Dies entsprach der Positivkontrolle von *E.coli*-exprimiertem murinem I-TAC und bezeichnete das Monomer von I-TAC(1-3)del (9,1kDa). Da keine weiteren Banden detektiert wurden, schien keine Oligomerisierung von I-TAC(1-3)del stattzufinden. Ein durchgeführter Glykosidase-F-Verdau für I-TAC(1-3)del fiel negativ aus und deckte sich mit den theoretischen Untersuchungen der Proteindatenbank Swiss-Prot. Es wurden weder N- noch O-Glykosylierungstellen für I-TAC(1-3)del ermittelt.



**Abb. 3-20C: Western-Blot-Analyse zu I-TAC(1-3)del.** I-TAC(1-3)del-haltiger *Pichia*-Überstand (1, 2,5, 5µg I-TAC(1-3)del) wurde in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mittels spezifischem Anti-I-TAC-Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle wurden 200ng und 20ng rekombinantes I-TAC verwendet. Als Negativkontrolle diente 1µg Leervektor. M: Multimark-Standard (Invitrogen).

Zusammenfassend konnte durch die Western-Blot-Analysen die spezifische Immunreaktivität jedes einzelnen in *Pichia*-generierten Muteins bestätigt werden. Die Proteingrößen entsprachen den Größen der Kontrollproteine (Monomere). Für MCP-1(1-8)del und vMIP-II konnte eine Multimerbildung beobachtet werden, während I-TAC(1-3)del diese nicht zeigte. Für keines der Muteine konnte eine N-Glykosylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

#### 3.3.4 Aminosäure-Sequenzierung (Edman-Abbau)

Zur Überprüfung der korrekten N-terminalen Deletionen von MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del wurde eine Sequenzierung der ersten 15-20 Aminosäuren vom N-Terminus mittels Edman-Abbau durchgeführt. Die Aminosäure-Sequenzierung wurde freundlicherweise für

beide N-terminal veränderten Chemokine von Herrn Dr. H.W. Heid (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Die Muteine wurden dazu auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und an Herrn Dr. Heid gesendet. Abbildung 3-21 stellt durch Edman-Abbau ermittelte N-terminale Aminosäuresequenz beider Muteine im Vergleich zur nativen, *online* publizierten Sequenz dar (NCBI).

|                |            |            |            |                         |
|----------------|------------|------------|------------|-------------------------|
| Wt MCP-1       | 10         | 20         | 30         | 40                      |
| mMCP-1(1-8)del | MQVPVMLLGL | LFTVAGWSIH | VLAQPDVNA  | PLTCCYSFTS KMIPMSRLES.. |
|                |            | EAE        | ALTCCYSFTS | KMIPMSRLES..            |
| Wt ml-TAC      | 10         | 20         | 30         | 40                      |
| ml-TAC(1-3)del | MNRKVTAIAL | AAIWATAAQ  | GFLMFKQGRC | LCIGPGMKAV KMAEIEKASV.. |
|                |            | YVE        | FKQGRC     | LCIGPGMKAV KMAEIEKASV.. |

**Abb. 3-21: N-terminale Aminosäuresequenz von MCP-1(1-8)del (oben) und I-TAC(1-3)del (unten).** Die Tabelle zeigt die durch Edman-Abbau erhaltene Sequenz der Muteine im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz (Pubmed). Grün dargestellt sind Aminosäurereste, die aufgrund der Spaltung von *P. pastoris* aus pPIC9K resultieren. Orange hervorgehoben sind die Aminosäuren des Signalpeptids.

Das Ergebnis der N-terminalen Aminosäure-Sequenzierung zeigte, dass im Falle von MCP-1(1-8)del vier zusätzliche Aminosäuren bestehend aus einer Glutaminsäure-Alanin-Wiederholung (Glu-Ala-Glu-Ala) am N-Terminus vorkommen. Diese Aminosäuren gehören zur internen Schnittstelle KEX2, die von *Pichia* zur Prozessierung der  $\alpha$ -Faktor Signalsequenz benutzt wird. Im Hinblick auf die funktionelle Aktivität des Antagonisten waren diese Aminosäuren jedoch unbedenklich, da sie keine für die Bioaktivität von MCP-1(1-8)del relevanten Aminosäuren darstellten. Die Sequenzierung von I-TAC(1-3)del zeigte, dass drei zusätzliche Aminosäuren Y-V-E (Tyrosin-Valin-Glutamin) am N-Terminus vorkommen. Diese drei Aminosäuren resultieren aus der I-TAC-Klonierung mittels *EcoRI/NotI*-Restriktion in der multiplen Klonierungsstelle. Auch diese zusätzlichen Aminosäuren konnten die Funktionalität des Antagonisten nicht beeinträchtigen, da keine Aminosäuren der nativen Sequenz erhalten wurden.

Aus der Literatur ist die, durch *Pichia*-Signalpeptid-Prozessierung entstehende, Modifizierung von Proteinen durch einzelne Aminosäuren bekannt und wird in der Diskussion weitergehend behandelt.

### 3.4. Aufreinigung der Muteine

Für die Aufreinigung der Muteine wurden verschiedene Methoden durchgeführt.

*Cross-flow*-Filtration:

Für die Aufarbeitung und Konzentrierung mehrerer Liter vMIP-II-haltigen Kulturmediums wurde eine von der DFG als Leihgabe zur Verfügung gestellte Sartorius *cross-flow*-Filtrationsanlage verwendet. Der gesamte Vorgang erfolgte bei 4°C im Kühlraum. Zwei bis drei Liter vMIP-II-haltiger *Pichia*-Überstand wurden in einen Meßzylinder gefüllt und mehrere Stunden filtriert. Dabei wurde der Überstand zunächst über einen 100kDa-Filter geleitet, um höhermolekulare Proteine abzutrennen. In einem weiteren Schritt wurde der Überstand über einen 1kDa-Filter geleitet, um den Überstand aufzukonzentrieren. Anschließend wurde der spezifische Proteingehalt an vMIP-II mittels ELISA bestimmt, die Probe auf einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Es zeigte sich an der Bestimmung im ELISA, dass durch die Filtration  $\frac{3}{4}$  der immunreaktiven Ausgangskonzentration verloren gingen (vor Filtration: 800µg/ml, nach Filtration: 200µg/ml vMIP-II). Für eine Methode zur Konzentrierung und Vorreinigung war dieser Proteinverlust zu hoch, so dass im Weiteren davon Abstand genommen wurde.

#### 3.4.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Eine Eigenschaft der meisten Chemokine ist ein hoher isoeletrischer Punkt (pI) in einem Bereich von 9-11. Ein hoher pI bedeutet, dass die generierten Muteine bei physiologischem pH-Wert als Kationen vorliegen und an Kationenaustauscher binden.

Zum einen wurde mittels Ionenaustausch-Chromatographie im *batch*-Verfahren ohne ein Flüssigchromatographie-System (FPLC) versucht, die Muteine über ihre Ladung an spezifische Sepharose-Beads zu binden und sie, nachdem ungebundenes Mutein über Zentrifugation entfernt wurde, über einen NaCl-haltigen Puffer von den Beads zu eluieren. Dazu wurden die Sepharose-SP- und Q-Beads von Amersham verwendet und die Bindung von z.B. vMIP-II an diese Beads mit Puffern verschiedener pH-Werte untersucht (siehe Methoden). Die Inkubation mit den Beads erfolgte auf einem Rollschüttler bei 4°C und die Sedimentierung der Beads wurde durch Zentrifugation erreicht. Die Methode konnte eine nur ungenügende Isolierung von vMIP-II erreichen, dessen Proteingehalt im ELISA kaum detektierbar war. Die Methode wurde daraufhin nicht weiter verfolgt.

### 3.4.2 Heparin-Affinitätschromatographie

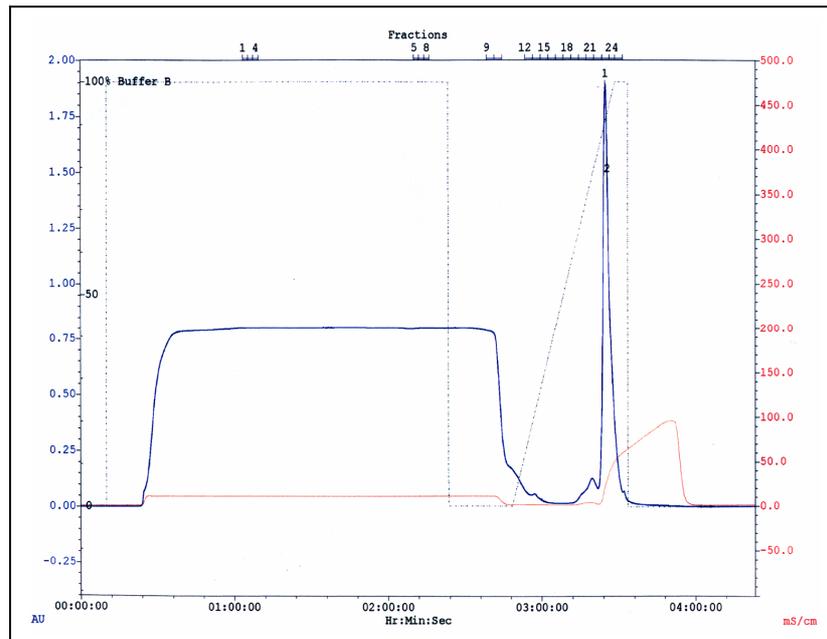
Für die Aufreinigung der Muteine aus dem *Pichia*-Überstand wurde letztlich die Heparin-Affinitätschromatographie verwendet. Wie in den letzten Jahren der Chemokinforschung immer deutlicher wurde, spielen Glukosaminoglykane (GAGs) der Extrazellulären Matrix (EM) für die Wirkung von Chemokinen eine entscheidende Rolle. Chemokine binden mit basischen Aminosäureresten, die sich in der „Matrix-bindenden Domäne“, einer alpha-helikalen Struktur vor dem C-Terminus befinden, an saure Zuckermoleküle (GAGs) der EM und sorgen so für die Bildung eines Gradienten innerhalb des Gewebes.

#### Affinitätschromatographie zu MCP-1(1-8)del

Die Aufreinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie hatte bei jedem einzelnen Mutein im Vergleich zur Ausgangskonzentration einen hohen Proteinverlust bzw. eine Verdünnung der Antagonisten-Konzentration zur Folge. Auf diese Problematik wird in der Diskussion detailliert eingegangen.

Im Falle der Aufreinigung von MCP-1(1-8)del wurden 200ml MCP-1(1-8)del-enthaltender *Pichia*-Überstand über die FPLC-Anlage auf die Säule appliziert. Das Chromatogramm (Abb. 3-22A) zeigt den Vorgang durch einen Anstieg der Absorption bis 0,8AU über fast zwei Stunden, hervorgerufen durch Proteine, die nicht an die Säule binden. Im Anschluss wurde die Säule mit Tris-Puffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen. Dies ist am leicht verzögerten Abfall der Absorption auf den Nullwert zu erkennen. Bei der Auswertung des Chromatogramms war zu beachten, dass aufgrund der Säulenlänge eine zeitliche Verzögerung zwischen tatsächlichem und theoretischem Verlauf bestand. Die Elution erfolgte mittels stufenlosem NaCl-Gradienten und stetiger Sammlung von 2ml-Fractionen. Die statistische Auswertung von sechs FPLC-Läufen ergab, dass MCP-1(1-8)del bei einer theoretischen NaCl-Konzentration von  $0,72 \pm 3,5M$  eluiert wurde.

Das Elutionsprofil für eine beispielhafte Säulen chromatographie von MCP-1(1-8)del ist in **Abbildung 3-22A** dargestellt; der zugehörige Western Blot wird in **Abbildung 3-22B** gezeigt.



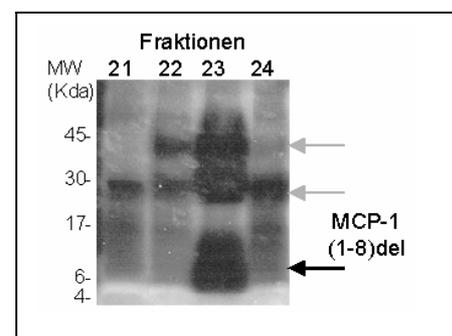
**Fig. 3-22A: Elutionsprofil der Aufreinigung von MCP-1(1-8)del aus *Pichia*-Überstand.** MCP-1(1-8)del-enthaltender *Pichia*-Überstand wurde auf eine Heparinsäule geladen, ungebundenes Mutein durch Waschen entfernt und gebundenes MCP-1(1-8)del durch einen stufenlosen NaCl-Gradienten eluiert. Die X-Achse stellt den zeitlichen Verlauf dar, auf der Y-Achse ist die Absorption in Form von Absorptionseinheiten (AU) aufgetragen. Aufgrund der Säulenlänge besteht eine zeitliche Verzögerung zwischen tatsächlichem und theoretischem Verlauf. Gestrichelte Linie: %NaCl-Konzentration, Rote Linie: Leitfähigkeit, Blaue Linie: Probenverlauf.

Der Gehalt an MCP-1(1-8)del wurde mittels *Sandwich*-ELISA bestimmt, die Proben auf einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western Blot analysiert.

Für die Fraktionen 22 bis 24 ergaben sich folgende beispielhafte MCP-1(1-8)del-Konzentrationen im Sandwich-ELISA: 21= 170pg/ml, 22= 450pg/ml, 23= 1,8ng/ml, 24= 1,0ng/ml. 40µl der Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. Das Ergebnis zeigte, dass die Proteinkonzentration im Vergleich zum eingesetzten Mutein stark verdünnt wurde (ca. Faktor 10.000) und nur eine geringe Ausbeute mit dieser Methode erzielt wurde (siehe Diskussion). Die Ergebnisse des ELISAs korrelierten mit den Signalen, die sich in der Western-Blot Analyse zeigten. Fraktion 23 enthielt in diesem Experiment den höchsten Gehalt an MCP-1(1-8)del.

**Abb. 3-22B: Western Blot Analyse für eine MCP-1(1-8)del-Aufreinigung.**

Dargestellt sind die Fraktionen 21-24 des Elutionsprofils aus Abbildung 3-15A. Die Fraktionen wurden auf einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferriert. Fraktion 23 korreliert mit dem Elutionspeak und wurde für die funktionellen Tests verwendet.

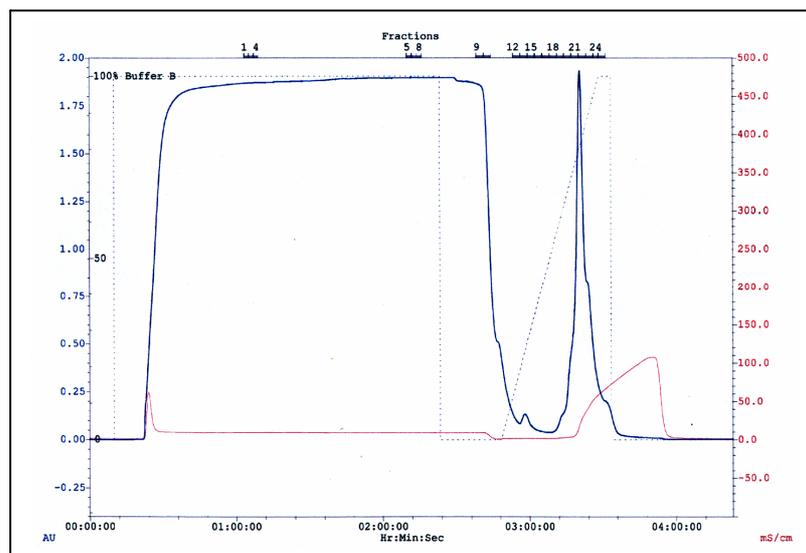


Zudem konnte man durch die Western-Blot-Analyse sehen, dass sich in den Fraktionen ein unterschiedliches Bandenmuster von MCP-1(1-8)del ergab. Die Fraktion 23 in **Abbildung 3-22B** zeigt ein ähnliches Bandenmuster wie die Western-Blot-Analyse der MCP-1(1-8)del-Expression nach einfacher Aufkonzentrierung der *P. pastoris*-Überstände (**Abb. 3-20A**). Die restlichen Fraktionen 21, 22 und 24 weisen im Gegensatz dazu nur höhermolekulare Banden auf. Dies ließ auf eine Formation von Multimeren bei MCP-1(1-8)del schließen, welche abhängig von der Salzkonzentration eluiert wurden.

### Affinitätschromatographie zu vMIP-II

Die Heparin-Affinitätschromatographie wurde weiterhin für die Aufreinigung von vMIP-II aus dem *Pichia*-Überstand verwendet. Auch hier war generell zu beobachten, dass es zu einer massiven Verdünnung der anfänglichen vMIP-II-Konzentration und zu einer geringen vMIP-II-Ausbeute kam.

200ml vMIP-II-haltiger *Pichia*-Überstand (200µg/ml; Gesamtmenge: ~40mg vMIP-II) wurde mittels Pumpe auf die Säule appliziert. **Abbildung 3-23A** zeigt ein beispielhaftes Elutionsprofil für die Aufreinigung von vMIP-II mittels Affinitätschromatographie.

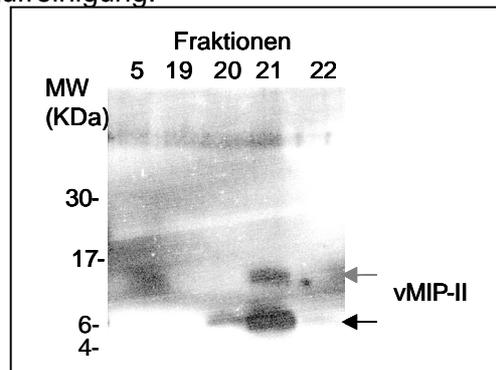


**Abb. 3-23A:** Elutionsprofil der Aufreinigung von vMIP-II aus *Pichia*-Überstand. VMIP-II-enthaltender *Pichia*-Überstand wurde auf eine Heparinsäule geladen, ungebundenes vMIP-II durch Waschen entfernt und gebundenes vMIP-II durch einen stufenlosen NaCl-Gradienten eluiert. AU: Absorptionseinheiten. Gestrichelte Linie: %NaCl-Konzentration, rote Linie: Leitfähigkeit, blaue Linie: Probenverlauf.

Der erste Peak über etwa zwei Stunden zeigt die Auftragung der Probe auf die Säule und die hohe Absorption zeigt, wie bereits bei MCP-1(1-8)del, dass ein Grossteil der Proteine die Säule ungebunden verlässt. Anschließend erfolgte der Waschschrift der Säule mit Puffer, um ungebundenes Protein von der Säule zu entfernen. Der anschließende Absorptionspeak bei 1,9AU repräsentierte das von der Säule eluierte vMIP-II. An der verspätet einsetzenden

Änderung der Leitfähigkeit (rote Linie) war ersichtlich, dass die Elution von vMIP-II bereits mit Einsetzen des NaCl-Gradienten begonnen hatte. Die theoretisch ermittelte NaCl-Konzentration, bei der vMIP-II eluiert wurde, konnte mit  $0,59 \pm 7,3\text{M}$  ( $n=5$ ) angegeben werden.

Zur Bestimmung der vMIP-II-Konzentration wurde ein ELISA und anschließend eine Western Blot Analyse mit einem Teil der Fraktionen durchgeführt. **Abbildung 3-23B** zeigt den Western-Blot zur vMIP-II-Aufreinigung.



**Abb. 3-23B: Western-Blot-Analyse der vMIP-II-Aufreinigung mittels FPLC.** 40 $\mu$ l der Waschfraktion 5 und der Elutionsfraktionen 19-22 wurden auf einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit einem spezifischen Anti-vMIP-II-Antikörper detektiert. Fraktion 20 zeigt die Monomer-Bande bei etwa 8KDa. Fraktion 21 zeigt eine zusätzliche Bande bei etwa 16KDa (mögliches Dimer). Elutionsfraktion 21 korrelierte mit dem Elutionspeak aus Abb. 3-23A, enthielt die höchste Menge an vMIP-II und wurde für funktionelle Tests verwendet.

Das Elutionsmaximum aus **Abbildung 3-23A** korrelierte mit dem erhöhten Proteingehalt, der im Western-Blot zu sehen war. Fraktion 21 beinhaltet in diesem Fall den größten Anteil des gereinigten vMIP-II (2 $\mu$ g/ml). Die Elutionsfraktionen aus verschiedenen Aufreinigungen wurden vereinigt, dialysiert und in funktionellen Tests verwendet (siehe Kapitel 3.3). Der Verdünnungseffekt (Faktor 20.000) zum zuvor eingesetzten vMIP-II-Gehalt wird hier ebenfalls deutlich (siehe Diskussion).

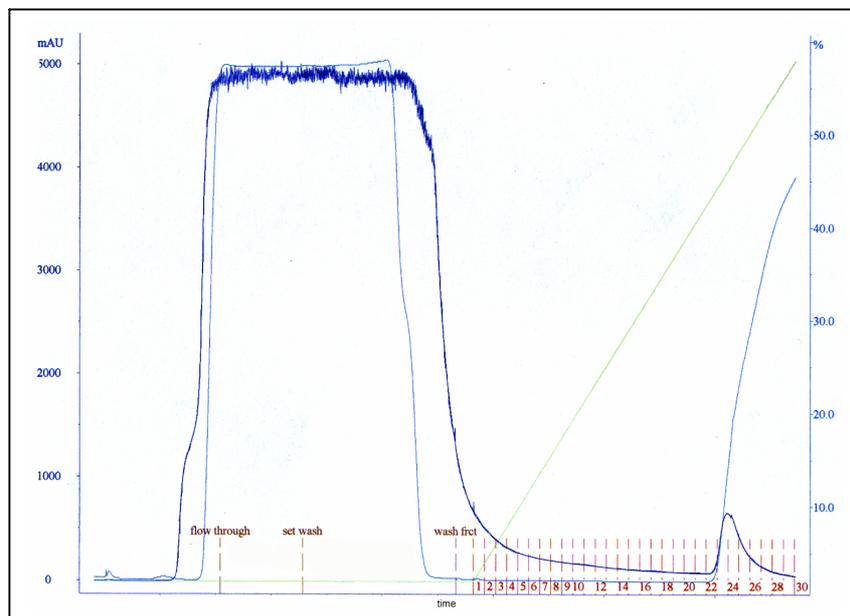
### Affinitätschromatographie zu I-TAC(1-3)del

Die Aufreinigung von I-TAC(1-3)del erfolgte zunächst mittels Lyophilisierung und Filtration (siehe Methoden). Durch die Lyophilisierung konnte eine hohe Konzentration des Muteins erreicht werden. Aufgrund der geringen Fremdprotein-Expression, die sich aus der SDS-PAGE und anschließenden Western Blot Analyse von I-TAC(1-3)del ergab, schien es zunächst zu genügen die nicht erwünschten höhermolekularen Proteine durch Filtration über einen 30kDa-Filter abzutrennen.

Der Umgang mit I-TAC(1-3)del wurde insgesamt durch die Tatsache erschwert, dass durch jeden Behandlungsschritt der I-TAC(1-3)del -Proteinverlust sehr hoch war oder dessen Bioaktivität verloren ging. Zudem führte jede Erhöhung des pH-Wertes in physiologischeren Bereich ab einem pH-Wert von 6,9 zum irreversiblen Ausfällen des Proteins.

Das auf diese Weise gereinigte I-TAC(1-3)del wurde in funktionellen Versuchen wie dem Chemotaxis-Assay eingesetzt und zeigte eine überaus dominante Inhibition der Th1-Migration, auch wenn andere als CXCR3-Liganden als Agonisten eingesetzt wurden. Leider zeigte der auf gleiche Weise behandelte Leervektor-Überstand ebenso inhibitorische Effekte auf die Th1-Migration, so dass davon ausgegangen wurde, dass zusätzliche im Medium vorhandene Komponenten neben dem Mutein selbst zu einer Inhibition führten. Unspezifische Effekte u.a. auf die MCP-1-induzierte Migration (Daten nicht gezeigt) führten zu der Erkenntnis, dass diese Art der Aufreinigung von I-TAC(1-3)del nicht genügend sauberes Mutein ergab, so dass die Aufreinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie weiterverfolgt wurde.

In **Abbildung 3-24A** ist beispielhaft ein Säulenchromatogramm der Aufreinigung von I-TAC(1-3)del mittels Heparinsäule dargestellt. Die HiPrep-Säule wurde, wie beschrieben, equilibriert und 45ml lyophilisierter I-TAC(1-3)del-enthaltender *Pichia*-Überstand (840µg/ml; Gesamtmenge an I-TAC(1-3)del: ~38mg) aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels stufenlosem Salzgradienten (grüne Linie). Der darauf folgende Elutionspeak repräsentiert die Elution von I-TAC(1-3)del mit sofortigem Einsetzen des Salzgradienten, was an der Veränderung der Leitfähigkeit abzulesen ist.

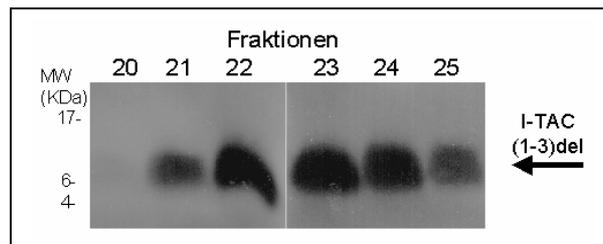


**Abb. 3-24A: Elutionsprofil der Aufreinigung von I-TAC(1-3)del aus *Pichia*-Überstand.** I-TAC(1-3)del-enthaltender *Pichia*-Überstand wurde auf eine Heparinsäule geladen, ungebundenes Mutein durch Waschen entfernt und gebundenes I-TAC(1-3)del durch einen stufenlosen NaCl-Gradienten eluiert. AU: Absorptionseinheiten. Grüne Linie: %NaCl-Konzentration, Hellblaue Linie: Leitfähigkeit, Dunkelblaue Linie: Probenverlauf.

Die Elution von I-TAC(1-3)del erreichte eine maximale Absorption von 600mAU. Aus der statistischen Auswertung aller FPLC-Läufe ergab sich eine theoretische NaCl-Konzentration

für die Elution von  $0,41 \pm 3M$ . Anhand der Leitfähigkeit zum Zeitpunkt der Elution lässt sich beobachten, dass mit sofortigem Einsetzen des Gradienten I-TAC(1-3)del eluiert wurde. Dies macht eine nur geringe Bindungsaffinität zur Säule deutlich.

Die Fraktionen 21-25 wurden als Elutionsfraktionen aus dem Chromatogramm ermittelt und deren spezifischer I-TAC(1-3)del-Gehalt mittels ELISA gemessen. Anschließend wurden die Fraktionen in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Western-Blot-Analyse der eluierten I-TAC(1-3)del-Fraktionen (**Abb. 3-24B**).



**Abb. 3-24B: Western-Blot-Analyse der I-TAC(1-3)del-Aufreinigung mittels FPLC.** 40µl der Elutionsfraktionen 21-25 aus Abbildung 3-24A wurden auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt, anschließend geblottet und mit einem spezifischen Anti-I-TAC-Antikörper detektiert. Alle Fraktionen zeigen eine, dem I-TAC(1-3)del-Monomer entsprechende, Bande bei etwa 9kDa. Die Fraktionen korrelierten mit dem Elutionspeak aus Abb. 3-18A, wurden vereinigt und für funktionelle Tests verwendet.

Ein repräsentativer ELISA ergab für die verschiedenen Elutionsfraktionen folgende I-TAC(1-3)del-Mengen: 21= 8,3µg/ml; 22= 8,1µg/ml; 23= 9,4µg/ml und 24= 9µg/ml, 25= 7,9µg/ml. Verglichen mit der eingesetzten I-TAC(1-3)del-Menge resultierte diese Methode auch im Falle des letzten Muteins in eine Verdünnung des Muteins (Faktor 1000).

In der Western-Blot-Analyse wurde für das FPLC-gereinigte I-TAC(1-3)del wiederholt nur eine Bande detektiert (Abb. 3-24B). Dies bestätigte die zuvor getroffene Annahme, dass I-TAC(1-3)del nicht zur Mutimerbildung zu neigen schien. Die aus verschiedenen Versuchen erhaltenen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und für funktionelle Tests verwendet (siehe Kapitel 3.3).

Zusammenfassend lässt sich über die Aufreinigung der Muteine mittels Heparin-Affinitätschromatographie sagen, dass durch diese Methode nur ein geringer Teil der zuvor eingesetzten Muteinmenge im Elutionspeak wiedergewonnen werden konnte. Die Ausbeute an optimal gereinigten Muteinen war gering, so dass dies der limitierende Faktor für die weiteren funktionellen Experimente darstellte.

Trotz der geringen Ausbeuten an gewünschtem Protein, war die Heparin-Affinitätschromatographie die einzige Methode, die zur Gewinnung von sauberen bioaktiven Chemokinrezeptor-Antagonisten führte.

## 3.5 Funktionelle Tests zur Bioaktivität der Antagonisten

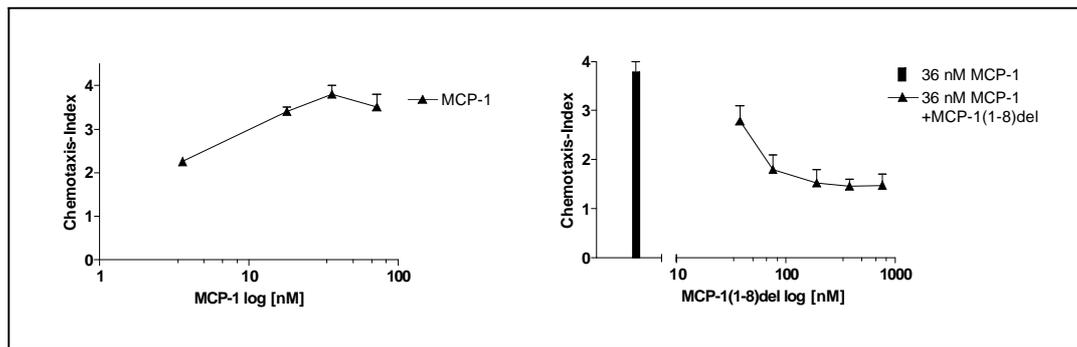
### 3.5.1 Inhibition der Liganden-induzierten Th1-Migration

Zur Kontrolle der Bioaktivität der generierten Chemokinrezeptor-Antagonisten, wurde der Chemotaxis- oder Migrations-Assay herangezogen. Die Aktivierung und aktive Wanderung von Immunzellen hinein in das entzündete Gewebe, wird mit dieser *in vitro*-Methode in einer Chemotaxiskammer nachgeahmt. Dazu werden die chemoattraktiven Zytokine (Chemokine) in verschiedenen Konzentrationen in die unteren Löcher der Kammer (96-Loch Einwegplatte) pipettiert. Ein mit Fibronectin oder Kollagen Typ IV beschichteter Polycarbonatfilter mit geeigneter Porengröße trennt die Chemokin-haltigen Löcher von dem oberen Teil der Kammer, in dessen Löcher eine definierte Zellzahl an Th1F12-Zellen appliziert wird. Die Kammer wird anschließend bei 37°C im Inkubator für zwei Stunden inkubiert. Neben einer basalen Migration, die auch als ungerichtete Migration (Chemokinese) bezeichnet wird und die man in den Mediumkontrollen beobachten kann, bewirken die chemoattraktiven Stoffe eine gerichtete Migration durch den beschichteten Filter in Richtung des Chemokingradienten.

Für die Auswertung dieser Methode wurden die Zellen, die durch den Filter gewandert waren und sich anschließend in den unteren Löchern der Kammer befanden, angefärbt und ausgezählt (siehe Methoden).

#### 3.5.1.1 Inhibition der MCP-1-induzierten Migration durch MCP-1(1-8)del

Zum Nachweis der gerichteten Migration von TH1F12-Zellen, spezifisch vermittelt durch den CCR2 Rezeptor, wurden verschiedene Konzentrationen an rekombinantem murinem MCP-1/CCL2 verwendet. In einem Konzentrationsbereich von 5-100nM ( $\cong$ 1-138ng/ml) MCP-1/CCL2 wurde entsprechend einer Gauß'schen Verteilung ein glockenförmiger Kurvenverlauf beobachtet. Die Migration der Th1-Zellen wurde mit zunehmender Konzentration an MCP-1/CCL2 gesteigert, erreichte in den meisten Versuchen eine maximale Migration bei 36nM MCP-1. Die MCP-1/CCL2-Konzentration von 36nM, die zu Beginn als aktive Konzentration ermittelt wurde, wurde anschließend für die Inhibitionsversuche mit MCP-1(1-8)del verwendet. Dazu wurden den 36nM MCP-1/CCL2 in den unteren Löchern der Chemotaxiskammer verschiedene Konzentrationen an MCP-1(1-8)del zugesetzt und deren inhibitorischer Effekt auf die Th1-Migration ermittelt. **Abbildung 3-25** zeigt einen beispielhaften Kurvenverlauf für die MCP-1-vermittelte Migration von Th1F12-Zellen (links) und den Kurvenverlauf für die MCP-1(1-8)del-vermittelte Inhibition dieser Migration (rechts).



**Abb. 3-25: MCP-1/CCL2-induzierte Migration von Th1F12-Zellen (links) und deren Inhibition durch MCP-1(1-8)del (rechts).** Gezeigt ist exemplarisch ein Experiment von sechs. Die maximale Migration der Th1-Zellen lag bei 36nM MCP-1. 50%ige Inhibition der Migration erfolgte bei 100nM MCP-1(1-8)del. Der Chemotaxis-Index beschreibt den Quotienten aus ermittelter Probenzellzahl und Zellzahl der Mediumkontrolle.

**Abbildung 3-25** (rechts) zeigt exemplarisch einen Versuch aus sechs durchgeführten Versuchen. Eine 50%ige Hemmung der maximalen Th1-Migration wurde bei einer 2,5-fachen MCP-1(1-8)del-Konzentration von 100nM erreicht. Eine maximale Migrationshemmung von 58% wurde bei einer Konzentration von 383nM MCP-1(1-8)del erreicht.

Nach Auswertung der gesamten Versuchsserie mit dem CCR2-Agonisten MCP-1 ergab sich eine maximale Migration bei  $40,6 \pm 2,9$ nM ( $n=7$ ). Nach Auswertung der gesamten Versuchsserie wurde für die Hemmung der MCP-1-induzierten Migration durch MCP-1(1-8)del wurde eine  $IC_{50}$  von  $66,3 \pm 4,5$ nM ( $n=6$ ) ermittelt.

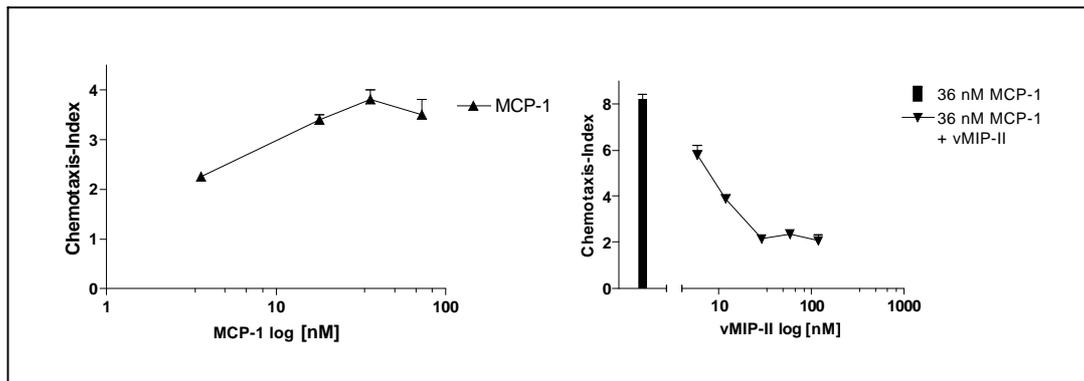
### 3.5.1.2 Inhibition der Th1-Migration durch vMIP-II

Der zweite rekombinant hergestellte Chemokinrezeptor-Antagonist ist unter natürlichen Bedingungen ein Chemokin des Kaposi's Sarkom-assoziierten Herpesvirus KSH/HHV-8.

Wie bereits erwähnt weist virales MIP-II sowohl agonistische als auch antagonistische Eigenschaften auf. Es ist in der Lage, die Chemokinrezeptoren CCR1, 2, 5 und CXCR4 zu blockieren, während es Zellen über den Rezeptoren CCR3 anlockt (Lindow et al., 2003). Im Jahr 1997 wurde durch Bindungsstudien gezeigt, dass vMIP-II die höchste Affinität zu CCR2 aufweist ( $IC_{50} = 0,82 \pm 0,16$ nM), gefolgt von CCR5 ( $IC_{50} = 5,2 \pm 1,9$ nM) und CXCR4 (Kledal et al., 1997).

Die Bioaktivität des generierten vMIP-II wurde im Chemotaxis-Assay mit zwei verschiedenen Stimuli untersucht. Zum einen wurde murines MCP-1/CCL2 als Stimulus für die CCR2-vermittelte Migration verwendet. Zum anderen wurde humanes RANTES/CCL5 für die CCR1/5-vermittelte Migration benutzt.

**Abbildung 3-26A** zeigt exemplarisch den Kurven-verlauf der MCP-1/CCL2-induzierten Th1-Migration und deren Inhibition durch vMIP-II.



**Abb. 3-26A: Inhibition der MCP-1/CCL2-induzierten Th1-Migration durch virales MIP-II.** Der linke Graph zeigt die maximale MCP-1-induzierte Migration bei 36nM. Der Graph rechts zeigt die Inhibition dieser maximalen Migration (schwarze Säule) durch steigende Konzentrationen an vMIP-II. Gezeigt ist eins aus drei durchgeführten Experimenten. Eine 50%ige Inhibition der Migration wurde bei 12nM vMIP-II erreicht; eine maximale Inhibition von 65% wurde bei einer Konzentration von 29nM erreicht. Der Chemotaxis-Index beschreibt den Quotienten aus Probenzellzahl und Zellzahl der Mediumkontrolle.

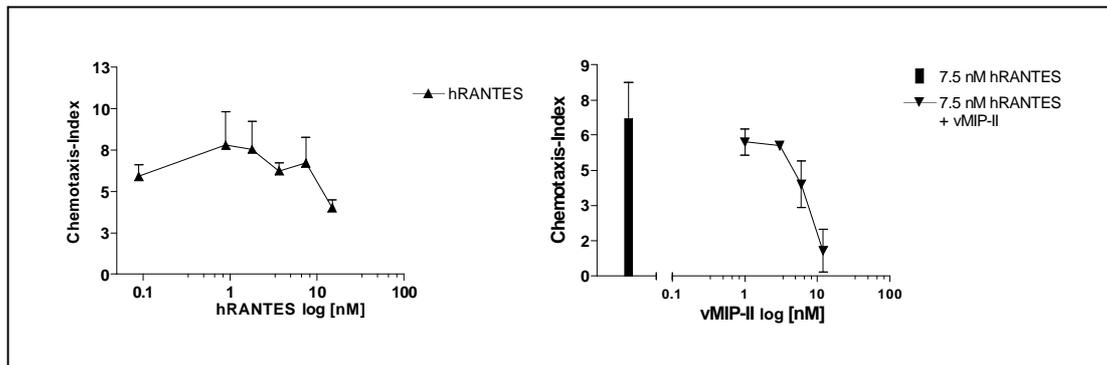
Bereits bei einer vMIP-II-Konzentration von 12nM war eine 50%ige Reduktion der Migration zu erkennen. Die maximale Inhibition von 65% wurde bei einer vMIP-II-Konzentration von 29nM erreicht.

Die Statistik über alle durchgeführten Experimente (n=3) zeigte eine 50%ige Inhibition ( $IC_{50}$ ) der MCP-1-induzierten Migration durch vMIP-II bei  $10,87 \pm 1,24$ nM, während eine maximale Migrationshemmung von 70,4% erreicht wurde.

### Inhibition der RANTES-induzierten Migration durch vMIP-II

Als zweiter Agonist für die inhibierende Wirkung von vMIP-II auf die Th1-Migration wurde humanes RANTES/CCL5 (hRANTES) verwendet. Für humanes RANTES wurde eine 85%ige Homologie zu murinem RANTES nachgewiesen und seine chemoattraktive Wirkung auf murine Zellen gezeigt (Qin et al., 1998). RANTES/CCL5 bindet mit hoher Affinität an CCR5; es hat zudem agonistische Aktivität auf die Rezeptoren CCR1 und CCR3 (Romagnani, 2002).

**Abbildung 3-26B** zeigt exemplarisch zum einen die hRANTES-induzierte Migration von Th1-Zellen, zum anderen deren Inhibition durch vMIP-II in einem Konzentrationsbereich von 0,1-120nM.



**Abb. 3-26B: hRANTES-induzierte Th1-Migration (links) und Inhibition der hRANTES-induzierten Th1-Migration durch vMIP-II (rechts).** Gezeigt ist je ein Einzelexperiment aus zwei durchgeführten. Eine maximale Th1-Migration wurde bei etwa 1nM hRANTES erreicht. Eine 50%ige Inhibition der RANTES-induzierten Migration konnte bei 6nM vMIP-II und eine maximale Inhibition von 72% bei einer vMIP-II Konzentration von 12nM beobachtet werden.

Im ersten Experiment zeigte sich eine maximale Migration der Th1-Zellen bei 7,5nM hRANTES/CCL5. 50% der Zellen wurden bei einer RANTES-Konzentration von 0,035nM zum Wandern gebracht. Für die Inhibition durch vMIP-II wurden 7,5nM hRANTES/CCL5 als Basisstimulierung verwendet. Der rechte Graph aus **Abbildung 3-26B** zeigte, dass eine 50%ige Inhibition der RANTES-induzierten Th1-Migration durch 6nM vMIP-II erreicht wurde, und eine maximale Inhibition von 72% ab 12nM vMIP-II erzielt wurde.

Das Ergebnis bestätigte die Bioaktivität des *Pichia*-generierten vMIP-II. Sowohl die MCP-1-induzierte als auch die hRANTES-induzierte T-Helfer-1-Zellmigration wurde von vMIP-II signifikant gehemmt. *Pichia*-generiertes virales MIP-II ist demnach ein potenter Antagonist, der die Akkumulation von CCR2 und CCR5-tragenden Immunzellen verhindert.

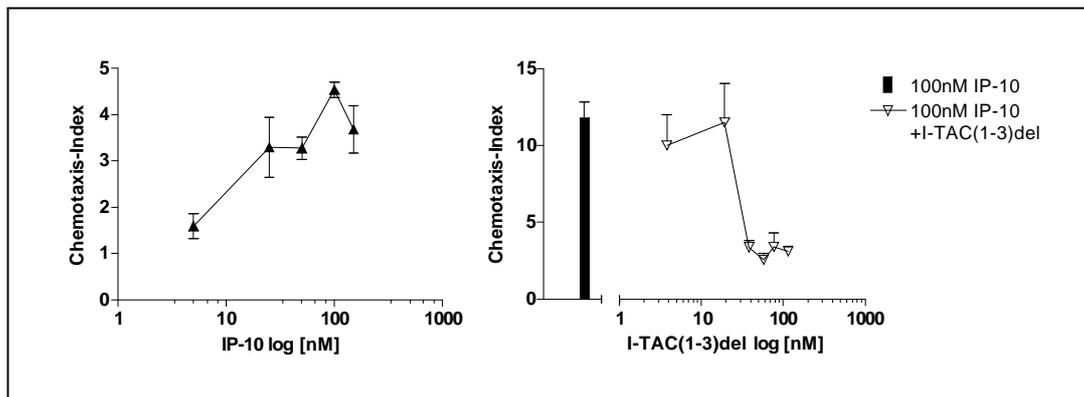
### 3.5.1.3 Inhibition der CXCR3-Liganden-induzierten Migration durch I-TAC(1-3)del

Der dritte in *Pichia* hergestellte Chemokinrezeptor-Antagonist, I-TAC(1-3)del, ist gegen den CXCR3-Rezeptor gerichtet. Es war bekannt, (pers. Kommun. mit P. Loetscher, Dr. Hans Schleussner Symposium 2002, Frankfurt), dass N-terminale Deletionen bei I-TAC/CXCL11 zu einer veränderten Aktivität des Chemokins führen. Während sich durch N-terminale Deletion bei IP-10 kein Antagonist herstellen ließ (Loetscher et al., 2001), führte die N-terminale Deletion der ersten drei Aminosäuren bei I-TAC zu einem potenten Rezeptorantagonisten für CXCR3.

Das durch Heparin-Affinitätschromatographie gereinigte I-TAC(1-3)del wurde im Chemotaxis-Assay auf seine Funktionalität untersucht. Dazu wurden die drei natürlichen Liganden von CXCR3, I-TAC/CXCL11, MIG/CXCL9 und IP-10/CXCL10, als Agonisten verwendet, deren Konzentration zum Erreichen der maximalen Th1-Migration ermittelt und

die inhibitorische Wirkung von I-TAC(1-3)del bei der jeweiligen Ligandenkonzentration untersucht.

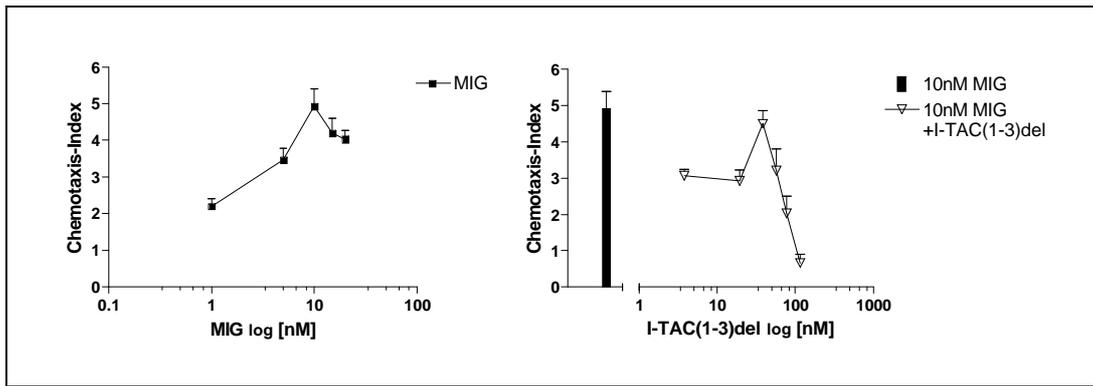
Der linke Graph von **Abbildung 3-27A** zeigt in einem beispielhaften Experiment den Kurvenverlauf der IP-10-induzierten Th1-Migration; der Graph rechts zeigt die hemmende Wirkung von I-TAC(1-3)del. Es wurden IP-10-Konzentrationen von 5-150nM eingesetzt, während I-TAC(1-3)del in den folgenden Experimenten in einem Konzentrationsbereich von 12,5-500nM verwendet wurde.



**Abb. 3-27A: IP-10-induzierte Migration von Th1-Zellen und deren Inhibition durch I-TAC(1-3)del.** Gezeigt ist ein Experiment aus mindestens drei durchgeführten. Der Graph links zeigt den Kurvenverlauf der IP-10-induzierten Th1-Migration. Die maximale Migration wurde bei etwa 100nM IP-10 erreicht. Der rechte Graph zeigt die inhibitorische Wirkung von FPLC-gereinigtem I-TAC(1-3)del auf die Maximalmigration. Eine 71%ige Inhibition der Migration wurde bei 125nM I-TAC(1-3)del erreicht.

Die Auswertung der gesamten Versuchsserie (n=12) ergab, dass 50% der Zellen bei einer IP-10-Konzentration von  $19 \pm 6,7$ nM zur Migration angeregt wurden, während eine maximale Migration bei einer Konzentration von  $99 \pm 16$ nM IP-10/CXCL10 erreicht wurde. Die statistische Auswertung von drei Inhibitionsversuchen ergab für I-TAC(1-3)del eine  $IC_{50}$  von  $64,8 \pm 2,3$ nM. Die Gesamtinhibition erreichte 89,7%.

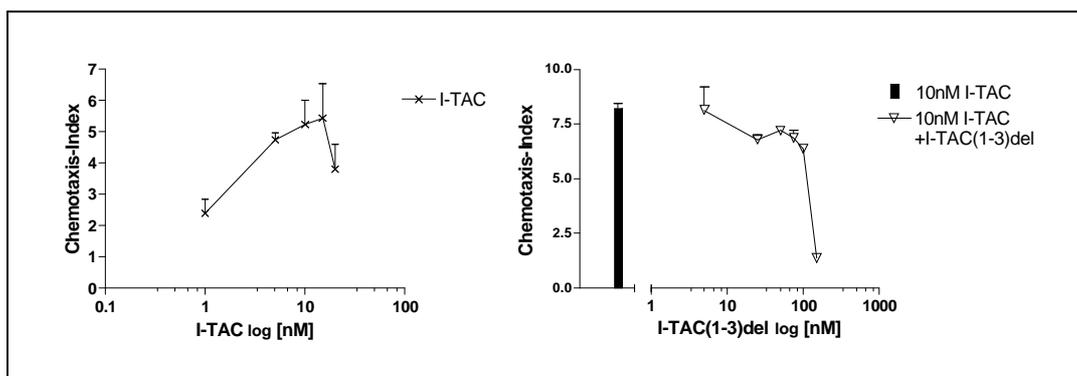
Ein zweiter natürlicher Ligand von CXCR3 ist MIG/CXCL9. Die Bioaktivität von I-TAC(1-3)del wurde als nächstes für die MIG-induzierte Migration untersucht. Mit steigenden Konzentrationen an MIG (0,01-500nM) konnte eine verstärkte Th1-Migration beobachtet werden, die ihren maximalen Wert bei 10nM MIG erreichte (**Abb. 3-27B**, links). Der rechte Graph zeigt beispielhaft die Inhibition der MIG-induzierten Th1-Migration durch I-TAC(1-3)del.



**Abb. 3-27B: MIG-induzierte Migration von Th1-Zellen (links) und deren Inhibition durch I-TAC(1-3)del (rechts).** Gezeigt ist ein Experiment von zwei durchgeführten. Der Graph links zeigt den Kurvenverlauf der MIG-induzierten Th1-Migration. Mit ansteigender MIG-Konzentration wurde die Migration verstärkt und erreichte ihren Maximalwert bei 10nM. Der rechte Graph zeigt die inhibitorische Wirkung von FPLC-gereinigtem I-TAC(1-3)del auf die Maximalmigration. Eine maximale Inhibition (63%) der Migration wurde bei 125nM I-TAC(1-3)del erreicht.

Das Ergebnis zeigte, dass mit steigender Konzentration an murinem MIG die Th1-Chemotaxis verstärkt wurde. Die Auswertung beider Versuche ergab eine Migration von 50% der Zellen bei einer MIG-Konzentration von  $0,3 \pm 0,1$ nM, während das Migrationsmaximum bei 10nM MIG erreicht wurde. Diese wurde anschließend als Ausgangskonzentration für die hemmende Wirkung von I-TAC(1-3)del verwendet. Die  $IC_{50}$  für die MIG-induzierte Th1-Migration wurde mit 98,5nM I-TAC(1-3)del ermittelt. Die Gesamteinhibition durch I-TAC(1-3)del erreichte 73,5%.

In weiteren Experimenten wurde die Stimulierung der Th1-Migration durch I-TAC/CXCL11, den dritten natürlichen CXCR3-Liganden, untersucht, sowie der hemmende Effekt von I-TAC(1-3)del auf die I-TAC-induzierte Migration. Dazu wurde I-TAC/CXCL11 in den Konzentrationen 0,01-500nM eingesetzt. **Abbildung 3-27C** zeigt exemplarisch den Kurvenverlauf der I-TAC-induzierten Th1-Chemotaxis (links) und die Hemmung dieser Migration durch I-TAC(1-3)del.



**Abb. 3-27C: I-TAC-induzierte Th1-Migration und deren Inhibition durch I-TAC(1-3)del.** Der Graph links zeigt den Kurvenverlauf der I-TAC-induzierten Th1-Migration. Mit ansteigender I-TAC-Konzentration wurde die Migration verstärkt und erreichte ihren Maximalwert bei 10nM. Der rechte Graph zeigt die inhibitorische Wirkung von FPLC-gereinigtem I-TAC(1-3)del auf die Maximalmigration. Eine 87,5%ige Inhibition der Migration wurde bei 125nM I-TAC(1-3)del erreicht.

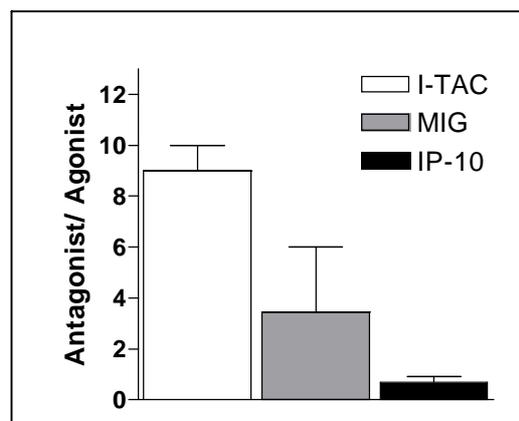
Mit steigender Konzentration an rekombinatem murinem I-TAC/CXCL11 wurde die Th1-Migration verstärkt. Aus dem Einzelexperiment ergab sich eine maximale Migration der Th1-Zellen bei 10nM I-TAC. Für die Untersuchung des Effektes von I-TAC(1-3)del wurden zu einer 10nM I-TAC-Konzentration steigende Konzentrationen des Antagonisten hinzugegeben. Eine maximale Inhibition der I-TAC-induzierten Migration von 87,5% konnte bei 125nM I-TAC erzielt werden.

Die Auswertung der gesamten Versuchsserie ergab, dass eine Migration von 50% der Zellen bei  $2,5 \pm 1,6$ nM I-TAC/CXCL11 erreicht wurde, während eine maximale Antwort bei  $12,5 \pm 1,6$ nM erzielt wurde ( $n=12$ ). Die  $IC_{50}$  für die I-TAC-induzierte Th1-Migration durch I-TAC(1-3)del lag bei etwa 117nM. Die Gesamtinhibition betrug 88%.

### 3.5.2 Bindungsaffinität der CXCR3-Liganden zu ihrem Rezeptor

Um eine Aussage über die Bindungsaffinitäten und molaren Verhältnisse zwischen Liganden und Antagonist am Rezeptor CXCR3 zu erhalten, wurde das molare Verhältnis des  $IC_{50}$ -Wertes von hemmendem Antagonist zu induzierendem Agonisten untersucht. Dazu wurde der Quotient aus den durchschnittlichen  $IC_{50}$ -Werten der I-TAC(1-3)del-Hemmung und der maximal stimulierenden Ligandenkonzentration ermittelt. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über diese Statistik (**Abb.: 3-28**).

Es bestätigte sich die Erkenntnis aus der Literatur, dass I-TAC/CXCL11 unter den CXCR3-Liganden die höchste Affinität zu CXCR3 aufweist. Die Grafik macht deutlich, dass zur Verdrängung der Agonisten vom Rezeptor jeweils ein molarer Überschuss des Antagonisten I-TAC(1-3)del von  $9 \pm 1$  für I-TAC/CXCL11 von  $3,5 \pm 2,6$  für MIG/CXCL9 und  $0,7 \pm 0,2$  für IP-10/CXCL10 benötigt wird.



**Abb. 3-28: Vergleichende Ratio der  $IC_{50}$ -Werte von I-TAC(1-3)del und maximal stimulierender Agonisten-Konzentration.** Die Konzentration von I-TAC(1-3)del, die zu einer 50%igen Inhibition der Liganden-induzierten Th1-Migration führte, wurde durch die Ligandenkonzentration bei maximaler Th1-Migration geteilt. Die Standardabweichung ist in  $\pm SD$  dargestellt,  $n=2$ ,  $p<0,3$ .

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Herstellung der Chemokinrezeptor-Antagonisten MCP-1(1-8)del, vMIP-II und I-TAC(1-3)del in *Pichia pastoris* zu voll funktionsfähigen Proteinen führte, die in der Lage waren, jeweils eine potente rezeptorspezifische Inhibition auszuüben.

### 3.5.3 Effekte von Chemokin-Kombinationen auf die Th1-Migration

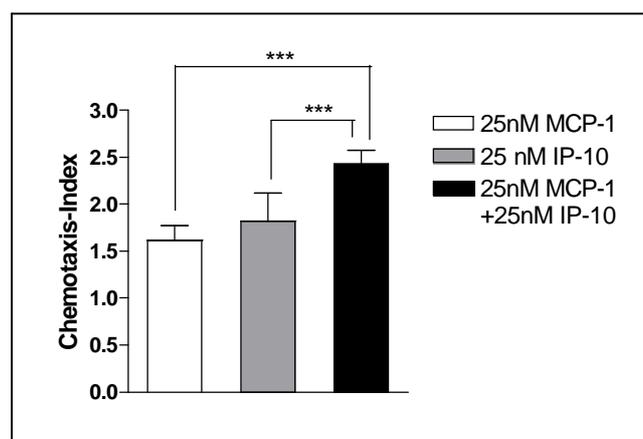
#### Kombination von MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10

In Annäherung an die pathophysiologische Situation wurde die kombinatorische Hemmung der Th1-Migration durch gleichzeitige Blockierung von zwei Chemokinrezeptoren durchgeführt.

Da in der Vergangenheit nur einzelne Chemokinrezeptoren als Zielort für Antagonisten oder Antikörper mit partiellem Erfolg bei entzündlichen Erkrankungen blockiert wurden (Panzer et al., 1999; Anders et al., 2003), wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine simultane Chemokinrezeptor-Blockade durch mehrere Antagonisten effektiver sein könnte. Mit Antikörpern konnte z.B. gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Einzelinhibition der kombinatorische Einsatz von Anti-CCR5, Anti-CXCR3 und Anti-CX3CR zu einer vollständigen Inhibition der Chemotaxis von aktivierten PBLs (*peripheral blood lymphocytes*) führte (Cockwell et al., 2002).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst der Effekt von zwei Chemokinen als Stimulus im Chemotaxis-Assay untersucht. Im Hinblick auf die kombinatorische Hemmung mit MCP1-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del wurden MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10 in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

**Abbildung 3-29** zeigt die statistische Auswertung der Effekte beider Stimuli auf die Th1-Migration.

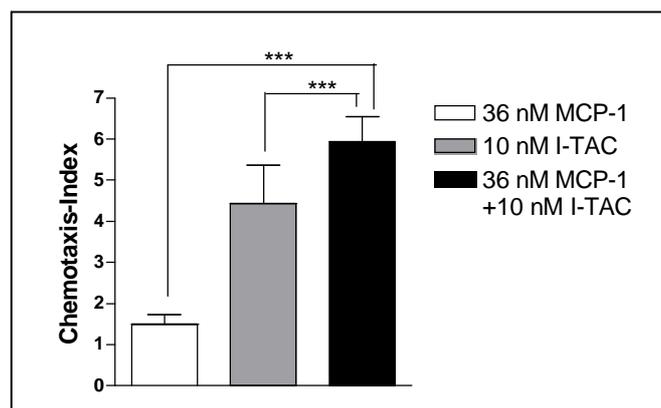


**Abb. 3-29: Effekt der Kombinationsgabe von MCP-1 und IP-10 auf die Th1-Migration.** Th1F12-Zellen zeigten bei einer Kombinationsgabe von 25nM MCP-1 und 25nM IP-10 im Chemotaxis-Assay eine signifikante Verstärkung der Migration gegenüber der Einzelstimulation. Die Signifikanz aus  $n=3$  wurde im Student's  $t$ -Test ermittelt. Die Standardabweichung ist in  $\pm$ SD dargestellt, \*\*\*:  $p<0,0001$ .

Die Kombination von MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10 resultierte in einer signifikanten, jedoch nicht additiven Steigerung der Th1-Migration (C.I.=  $2,4 \pm 0,14$ ) gegenüber der Einzelstimulierung von MCP-1/CCL2 (C.I.=  $1,62 \pm 0,16$ ) und IP-10/CXCL10 (C.I.=  $1,82 \pm 0,3$ ). Stellt man dieses Ergebnis prozentual dar, so ergibt sich durch die Kombination beider Stimuli eine Steigerung der Th1-Migration um 48% (MCP-1-induziert) bzw. 31,9% (IP-10-induziert) gegenüber dem jeweiligen Chemokin allein. Die Kombination noch höherer Konzentrationen an MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10 führte zu keiner deutlichen Migrationssteigerung, sondern resultierte in eine Sättigung der Migration.

### Kombination von MCP-1/CCL2 und I-TAC/CXCL11

Weiterhin wurde der Einfluss der Kombination von MCP-1/CCL2 und I-TAC/CXCL11 auf die Th1-Migration untersucht. Wie zuvor wurden verschiedene Konzentrationen dieser Chemokine verwendet. **Abbildung 3-30** stellt das statistische Ergebnis dieser Kombinationsgabe dar.

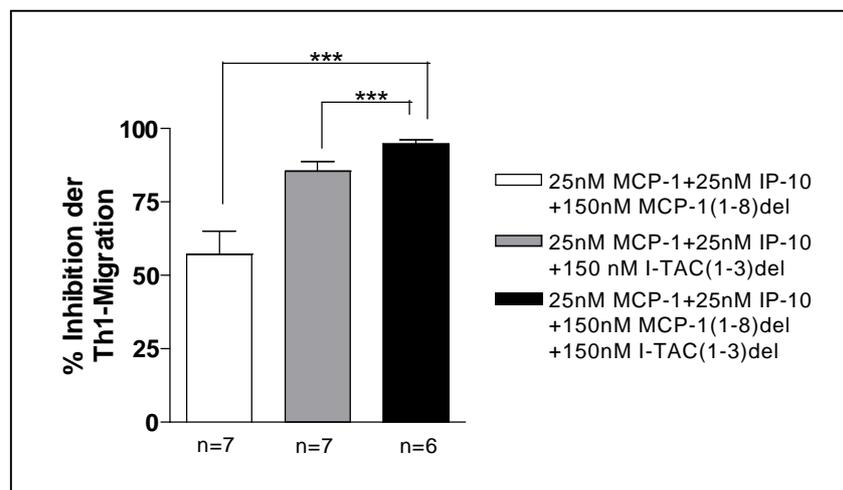


**Abb. 3-30: Effekt der Kombinationsgabe von MCP-1/CCL2 und I-TAC/CXCL11 auf die Th1-Migration.** Th1F12-Zellen zeigten bei einer Kombinationsgabe von 36nM MCP-1 und 10nM IP-10 im Chemotaxis-Assay eine signifikante Verstärkung der Migration gegenüber der Einzelstimulation. Die Signifikanz aus  $n=3$  wurde im Student's  $t$ -Test ermittelt. Die Standardabweichung ist in  $\pm$ SD dargestellt, \*\*\*:  $p < 0,0001$ .

Wie in **Abbildung 3-30** dargestellt, führte die Kombination von MCP-1/CCL2 und I-TAC/CXCL11 zu einer deutlichen Verstärkung der Th1-Migration (C.I.= $5,94 \pm 0,62$ ) gegenüber den Einzelstimulationen (MCP-1= $1,49 \pm 0,25$ ; I-TAC= $4,44 \pm 0,93$ ). Prozentual gesehen resultierte die Kombinationsgabe in eine Steigerung der Th1-Chemotaxis um 299% gegenüber der Einzelstimulation mit MCP-1 und um 33% gegenüber der Einzelstimulation mit I-TAC. Auch hier konnte durch Erhöhung der Chemokin-Konzentrationen keine Migrationssteigerung erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.5.4 Effekte kombinierter Chemokinrezeptor-Antagonisten auf die Th1-Migration

Im Folgenden wurde der Einfluss einer simultanen Hemmung mit MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del auf die MCP-1- und IP-10-stimulierte Th1-Chemotaxis untersucht. Dazu wurden je 25nM MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10, deren Kombination zuvor zu einer signifikant gesteigerten Th1-Chemotaxis geführt hatte, als Stimulus im Chemotaxis-Assay verwendet. Gleichzeitig wurde untersucht, welchen Effekt steigende Konzentrationen (5-150nM) von MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del, alleine oder in Kombination eingesetzt, auf die gesteigerte Th1-Migration haben. **Abbildung 3-31** fasst die Statistik über die maximal erreichte Hemmung bei 150nM in allen durchgeführten Experimenten zusammen.

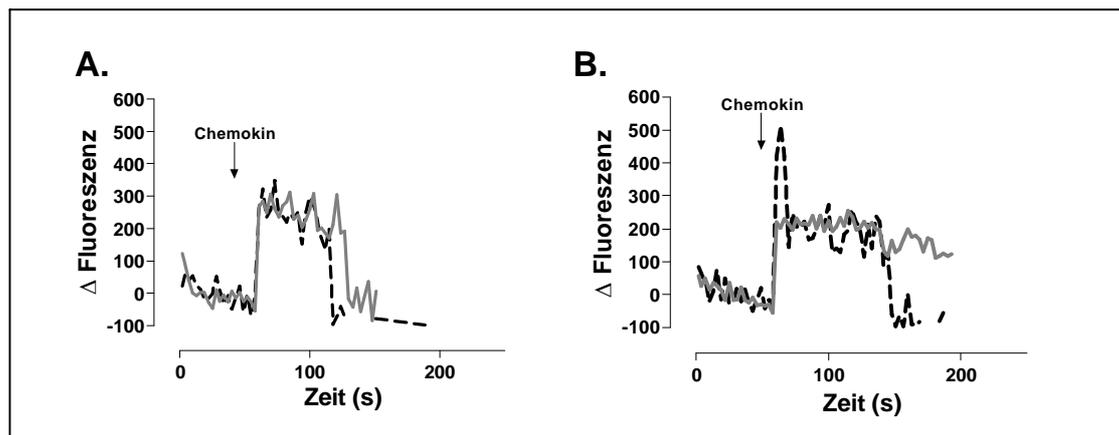


**Abb. 3-31: Effekt der simultanen Hemmung von MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del auf die MCP-1/IP-10-induzierte Th1-Migration.** Je 25nM MCP-1 und IP-10 wurden als Basisstimulus mit steigenden Konzentrationen an MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del alleine und in Kombination versetzt. Dabei wurde die statistische Signifikanz der maximal erreichten Th1-Hemmung der Antagonisten allein und der Kombination mittels Student's Test ermittelt und  $\pm$ SD dargestellt, \*\*\*:  $p < 0,0001$ . Das Ergebnis zeigt eine signifikante Steigerung der Th1-Inhibition durch Antagonisten-Kombination (94,7%) gegenüber der Einzelhemmung durch MCP-1(1-8)del (57%) und I-TAC(1-3)del (85,4%).

Die zusammenfassende Statistik zu der Kombinationsgabe von MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del zeigte, dass diese in eine zwar signifikante, jedoch nicht additiv gesteigerte Blockade der Th1-Migration ( $94,7 \pm 1,5\%$ ) gegenüber der Einzelhemmung von MCP-1(1-8)del ( $57 \pm 7,85\%$ ) und I-TAC(1-3)del ( $85,4 \pm 3,2\%$ ) resultierte. Die inhibitorische Wirkung von I-TAC(1-3)del allein war schon so dominant, dass durch die Kombination mit MCP-1(1-8)del nur eine etwa 10%ige Steigerung erzielt wurde.

### 3.5.5 Liganden-induzierte Kalzium-Mobilisierung von Th1-Zellen

Weiterhin wurde als funktioneller Test die Kalzium-Mobilisierung durch Chemokine in Th1-Zellen getestet. Dazu wurden die unstimulierten Th1F12-Zellen mit Fluo-3 AM gefärbt und anschließend der Einfluss verschiedener Chemokine auf die Kalzium-Antwort untersucht. Mittels eines Fluoreszenz-Readers wurde alle 3 Sekunden die Ratio 488/530nm gemessen. **Abbildung 3-32** zeigt beispielhaft die intrazellulären Kalziumanstiege induziert durch MIG und hRANTES (**A.**) sowie MCP-1 und I-TAC (**B.**)



**Abb. 3-32: Einfluss verschiedener Chemokine auf die Kalzium-Mobilisierung von Th1-Zellen.** Graph (A.) zeigt die Kalzium-Antwort von Th1-Zellen durch Stimulation mit 20nM MIG (graue Linie) und 20nM hRANTES (gestrichelte Linie) und Graph (B.) nach Stimulation mit 10nM I-TAC (gestrichelte Linie) und 36nM MCP-1 (graue Linie).

Die Messung der Kalzium-Mobilisierung mittels Fluoreszenz-Reader zeigte eine deutliche Kalzium-Antwort der Th1-Zellen in Folge der Chemokinstimulation. Die Kalzium-Antwort von MIG und hRANTES zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf (A.) mit einem leicht verzögertem Signalabfall. Während die Kurve von MCP-1 einen geringeren und länger anhaltenden Signalabfall zeigte, wurde für I-TAC ein biphasen-ähnlicher Verlauf des Kalziumsignals beobachtet (B.).

Die Ergebnisse ermöglichten jedoch keine Aussage über die Quelle der Kalzium-Ausschüttung. Zudem wurde vom Puffer (HBSS) ein Kalziumsignal ausgelöst, welches für die graphische Darstellung von den anderen Chemokin-induzierten Signalen subtrahiert wurde. Dennoch zeigte sich hier, dass es sich um ein suboptimales Verfahren zur Kalziummessung handelte, da die reproduzierten Signale schwankend waren (siehe Diskussion).

## 3.6 Untersuchungen zur Signalweiterleitung von CXCR3

Die Signale, die durch Chemokine und ihre Rezeptoren induziert werden und die verschiedenen Signalwege und Moleküle, die dabei involviert sein können, werden in der Literatur teils kontrovers diskutiert. So wurde als Voraussetzung für die Aktivität einiger Chemokine und ihrer Rezeptoren eine Dimerisierung beschrieben (siehe Kapitel 1.4). Hinsichtlich des weiteren Signalweges konnte gezeigt werden, dass z.B. für die Migration von Zellen je nach untersuchtem Chemokin unterschiedliche Moleküle der Signalkaskade involviert sein können, die zu einer Polarisierung der Zelle führen. Während fast alle Chemokine zu einer Aktivierung der PI3-Kinase (PI3K) in Lymphozyten führen, konnte nur für RANTES und SDF-1 eine Migrationsinhibition durch Inhibitoren der PI3K erzielt werden. Die Signalvermittlung über CXCR3 z.B. war davon unbeeinflusst (Iglesias et al., 2002; Ward, 2004). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Signalweiterleitung nicht nur von Chemokin zu Chemokin variieren kann, sondern sich ebenso für die induzierte Zellantwort unterscheidet.

Um die Signalweiterleitung durch den Rezeptor CXCR3 näher zu betrachten, wurde neben der FACS-Analyse (Internalisierung), der Chemotaxis-Assay und die Kalzium-Mobilisierung durchgeführt. Dazu wurden Th1F12-Zellen stets auf die gleiche Weise stimuliert und anschließend die Effekte mittels der unterschiedlichen Methoden untersucht. Inhibitoren bestimmter Signalwege dienten zur näheren Analyse der Signalweiterleitung. Zum einen wurden die Zellen mit dem Inhibitor Pertussis-Toxin (PTX) behandelt. PTX blockiert die Signalweiterleitung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren des Typs  $G_{\alpha_i}$ , über den die meisten Chemokine ihre Wirkung vermitteln. Als zweiter Inhibitor wurde AG490, auch Tyrphostin genannt, verwendet. AG490 ist ein Inhibitor der Janus-Familie von Tyrosinkinasen (Jaks) und hat eine relative Spezifität für Jak2 und Jak3. Chemokine können ihre Wirkung  $G_{\alpha_i}$ -unabhängig direkt über Tyrosinkinasen ausüben (Stein et al, 2003). Die Th1-Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert und im Anschluss mit verschiedenen Konzentrationen I-TAC bei 37°C für 30 Minuten versetzt. Als Kontrollen dienten Th1F12-Zellen, die einerseits ohne Inhibitoren und andererseits ohne I-TAC behandelt wurden.

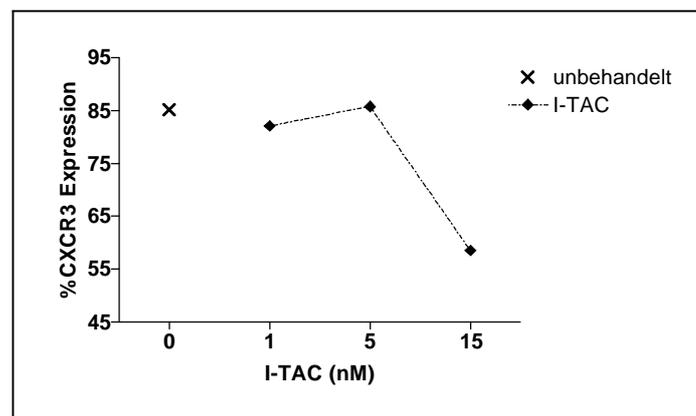
### 3.6.1 Internalisierung von CXCR3

#### I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung

Die Aktivierung eines Chemokinrezeptors durch seine Liganden führt meist zur Internalisierung und zum *Recycling* des Rezeptors durch die Zelle. Dies bedeutet, dass der

Rezeptor aufgrund des Chemokin-Stimulus durch Abschnürung der Membran von der Oberfläche entfernt (Internalisierung) und in einem Zeitrahmen von etwa 120 Minuten wieder auf die Zelloberfläche zurückgebracht wird (*Recycling*). Zu beachten ist, dass eine Zellaktivierung auch ohne Rezeptorinternalisierung möglich ist (Clark-Lewis et al., 2003).

Im nächsten Experiment wurde die I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung untersucht. Dazu wurden Th1F12-Zellen mit dem Liganden I-TAC/CXCL11 inkubiert. Die Effekte wurden anschließend anhand der Oberflächenexpression von CXCR3 mittels FACS-Analyse bestimmt. **Abbildung 3-33** zeigt zunächst die I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung.

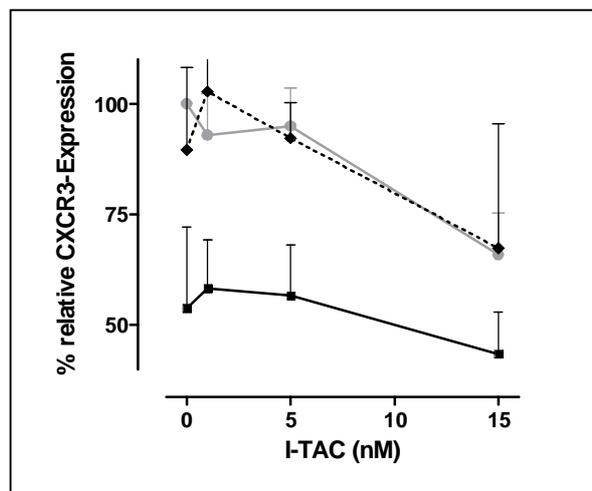


**Abb. 3-33: I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung.** Th1F12-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen I-TAC/CXCL11 bei 37°C für 30min behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet (gestrichelte Linie). Die CXCR3-Internalisierung wurde mittels FACS-Analyse untersucht. Es ist ein beispielhaftes Ergebnis aus drei durchgeführten Experimenten dargestellt. Statistisch wurde eine Reduktion der CXCR3-Expression von 34,3% bei 15nM I-TAC beobachtet.

Der Graph stellt ein beispielhaftes Ergebnis der CXCR3-Internalisierung dar. Statistisch zusammengefasst ergibt sich aus allen durchgeführten Experimenten eine Reduktion der CXCR3-Expression mit steigender I-TAC-Konzentration. Eine maximale Reduktion auf  $34,3 \pm 9,25\%$  wurde bei einer 15nM I-TAC-Konzentration erreicht. Es konnte damit bestätigt werden, dass steigende Konzentrationen von I-TAC zur Internalisierung seines Rezeptors CXCR3 auf der Oberfläche von Th1-Zellen führt.

### **Einfluss von PTX und AG490 auf die CXCR3-Internalisierung**

Im nächsten Schritt wurde der Effekt von Pertussis-Toxin und AG490 auf die I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung untersucht. PTX und AG490 beeinflussen bekanntermaßen die Signalweiterleitung über  $G\alpha_i$ - bzw. Jak-vermittelte Wege. Die Aktivierung von Signalwegen kann jedoch auch unabhängig von Internalisierungsvorgängen stattfinden (Müller et al., 2003). **Abbildung 3-34** zeigt beispielhaft ein Ergebnis dieser Experimente.



**Abb. 3-34: I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung (gestrichelt) und der Effekt von PTX (schwarz) und AG490 (grau) auf die I-TAC-induzierte CXCR3-Expression.** Th1-Zellen wurden eine Stunde mit PTX (10ng/ml) und AG490 (100 $\mu$ M) vorbehandelt, gewaschen, anschließend für 30min mit 1nM, 5nM und 15nM I-TAC inkubiert und die CXCR3-Expression im FACS untersucht. Als Kontrolle dienen unbehandelte Th1-Zellen, deren Wert als 100% veranschlagt wurde. Alle Werte sind  $\pm$ SEM dargestellt.

Das Ergebnis dieser Experimente zeigte, dass PTX von vorn herein eine Reduktion der CXCR3-Oberflächenexpression bewirkte. Die statistische Auswertung aus  $n=4$  ergab eine Verminderung der anfänglichen CXCR3-Expression auf  $56,5 \pm 9,5\%$ .

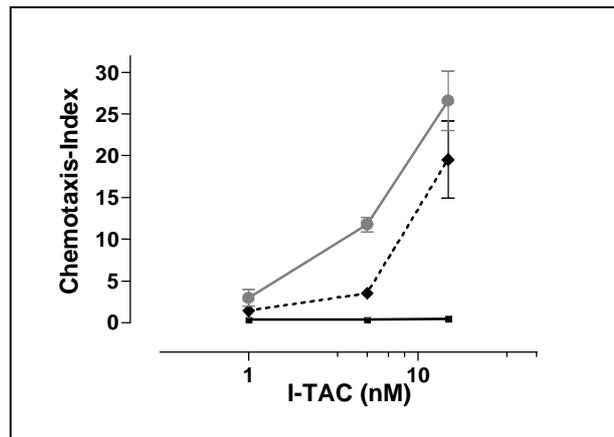
Die Internalisierung von CXCR3 durch ansteigende Konzentrationen von I-TAC/CXCL11 war jedoch vermindert. Dieses Ergebnis deckt sich mit Befunden aus der Literatur, bei denen ein inhibitorischer Einfluss von PTX auf die Liganden-induzierte Internalisierung von z.B. CCR5 festgestellt wurde. Die Vorinkubation mit einem Rho-Kinase (Y27632)- und einem PI3-Kinase-Inhibitor (LY294002) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die CCR5-Internalisierung (Müller et al., 2003).

Die CXCR3-Internalisierung wurde durch die Vorinkubation mit dem Jak/STAT-Inhibitor Tyrphostin (AG490) nicht beeinflusst. Die I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung wurde, ähnlich wie bei I-TAC/CXCL11 selbst, auf  $32,8 \pm 28,3\%$  reduziert. AG490 hatte diesem Ergebnis zu Folge keinen Einfluss auf den Prozess der Internalisierung von CXCR3.

### 3.6.2 Inhibitor-Effekte auf die I-TAC-induzierte Th1-Chemotaxis

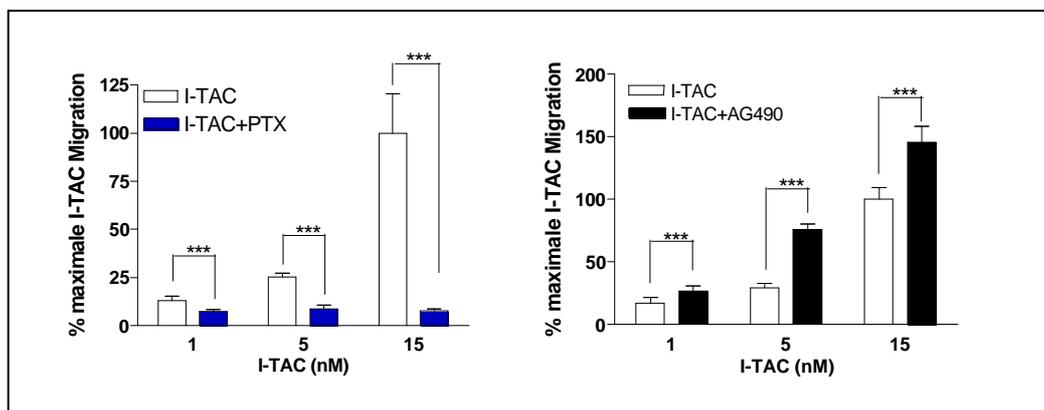
Im Folgenden wurde der Einfluss von Pertussis-Toxin und AG490 auf die I-TAC-induzierte Th1-Migration untersucht. Dazu wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit PTX und AG490 vorinkubiert und anschließend im Chemotaxis-Assay eingesetzt. Unbehandelte

Zellen dienten als Kontrolle. **Abbildung 3-35** zeigt den Kurvenverlauf aus drei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 3-35: Effekte von PTX und AG490 auf die I-TAC-induzierte Th1-Migration.** Th1 Zellen wurden eine Stunde mit PTX (schwarze Linie) und AG490 (graue Linie) vorbehandelt und anschließend verschiedenen Konzentrationen an I-TAC (1nM, 5nM, 15nM) ausgesetzt. Als Kontrolle wurden nicht vorbehandelte Zellen (gestrichelte Linie) eingesetzt. Der Chemotaxis-Index beschreibt den Quotienten aus ermittelter Probenzellzahl und Zellzahl der Mediumkontrolle (siehe Methoden).

Der Graph stellt den Mittelwert aus drei durchgeführten Experimenten dar. Er zeigte eine I-TAC-induzierte Th1-Migration, die eine maximale Antwort bei 15nM I-TAC erreichte. Pertussis-Toxin inhibierte diese I-TAC-induzierte Th1-Migration fast vollständig und bestätigte vorhergehende Befunde, dass alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ihre Signale mit einem großen Anteil über die  $G_{\alpha_i}$ -Untereinheit vermitteln, auch, wenn noch andere Untereinheiten eine Rolle spielen können. **Abbildung 3-36** zeigt die statistische Auswertung der Experimente.



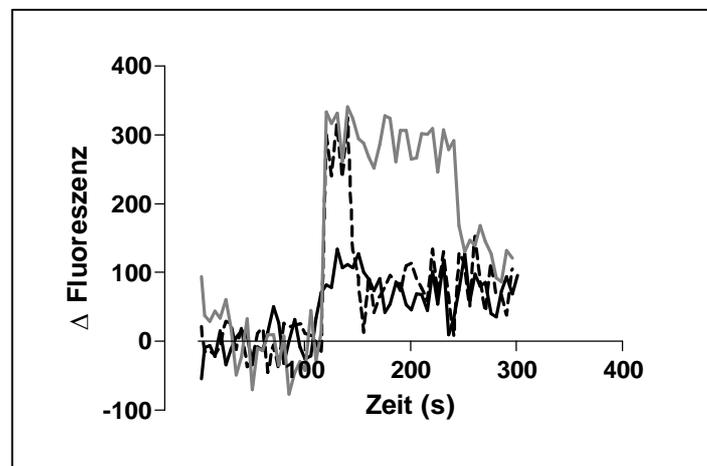
**Abb. 3-36: Statistische Auswertung der Effekte von PTX (links) und AG490 (rechts) auf die I-TAC-induzierte Th1-Migration.** Gezeigt ist die prozentuale Abweichung  $\pm$ SD der PTX- bzw. AG490-vermittelten Th1-Migration von der I-TAC-vermittelten Migration. Die maximale Th1-Migration bei 15nM I-TAC wurde als 100% definiert.

Das statistische Ergebnis zeigte, dass PTX die I-TAC-induzierte Th1-Migration bis zu 92% (15nM I-TAC/CXCL11) inhibierte, was die  $G_{\alpha_i}$ -vermittelte Signaltransduktion als Hauptweg bestätigte. AG490 bewirkte nicht, wie erwartet, eine Inhibition der Th1-Migration, sondern führte überraschenderweise zu einer signifikanten Steigerung der Th1-Chemotaxis. Die

Statistik zu AG490 zeigte, dass die Th1-Migration um maximal 158% (5nM I-TAC/CXCL11) gesteigert wurde.

### 3.6.3 Inhibitor-Effekte auf die Kalzium-Mobilisierung in Th1-Zellen

Die Kalzium-Mobilisierung wurde als zweiter funktioneller Test für die CXCR3-vermittelte Signaltransduktion verwendet. Dazu wurden die Th1-Zellen, wie zuvor beschrieben, mit PTX oder AG490 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit Fluo-3AM gefärbt und die Fluoreszenzänderung nach I-TAC-Zugabe ermittelt. **Abbildung 3-37** zeigt beispielhaft ein Einzelexperiment.



**Abb. 3-37:** Kalzium-Mobilisierung durch I-TAC-Zugabe bei PTX-behandelten (gepunktete Linie), AG490-behandelten (graue Linie) und unbehandelten (schwarze Linie) Th1-Zellen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der I-TAC-Zugabe (30µl, 15nM).

Das Ergebnis zeigt einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz, resultierend in einen Kalzium-Peak, sowie ein nach wenigen Sekunden abfallendes Fluoreszenzsignal nach I-TAC-Gabe bei den Kontrollzellen. Dieser Kalzium-Peak konnte nicht bei PTX-vorbehandelten Zellen beobachtet werden und ließ auf eine Inhibition der Kalzium-Mobilisierung durch PTX schließen. Bei AG490-vorbehandelten Zellen konnte eine verlängerte Kalzium-Antwort beobachtet werden, die erst nach 120s abfiel. AG490 scheint in Folge dessen einen deutlichen Einfluss auf die CXCR3-vermittelte Kalziumfreisetzung zu haben.

Eine verlängerte Freisetzung von Kalzium konnte im Zusammenhang mit der Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -aktivierten Ionenkanälen (*CRACs*- *calcium release activated channels*) beobachtet werden. Inwieweit diese verlängerte Kalzium-Antwort mit der gesteigerten Migration in Zusammenhang zu bringen ist, muss durch weitere Experimente untersucht werden.

### 3.7 Anwendung von I-TAC(1-3)del *in vivo*: Untersuchung der T-Zellmigration im Mausohr mittels Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie (IVM) wurde als *in vivo*-Methode zur Untersuchung des Rollverhaltens aktivierter Th1-Zellen verwendet. Sie ermöglicht einen direkten Blick auf die Interaktion zwischen exogen zugegebenen Zellen (Th1F12-Zellen) und den Endothelzellen im Mausohr.

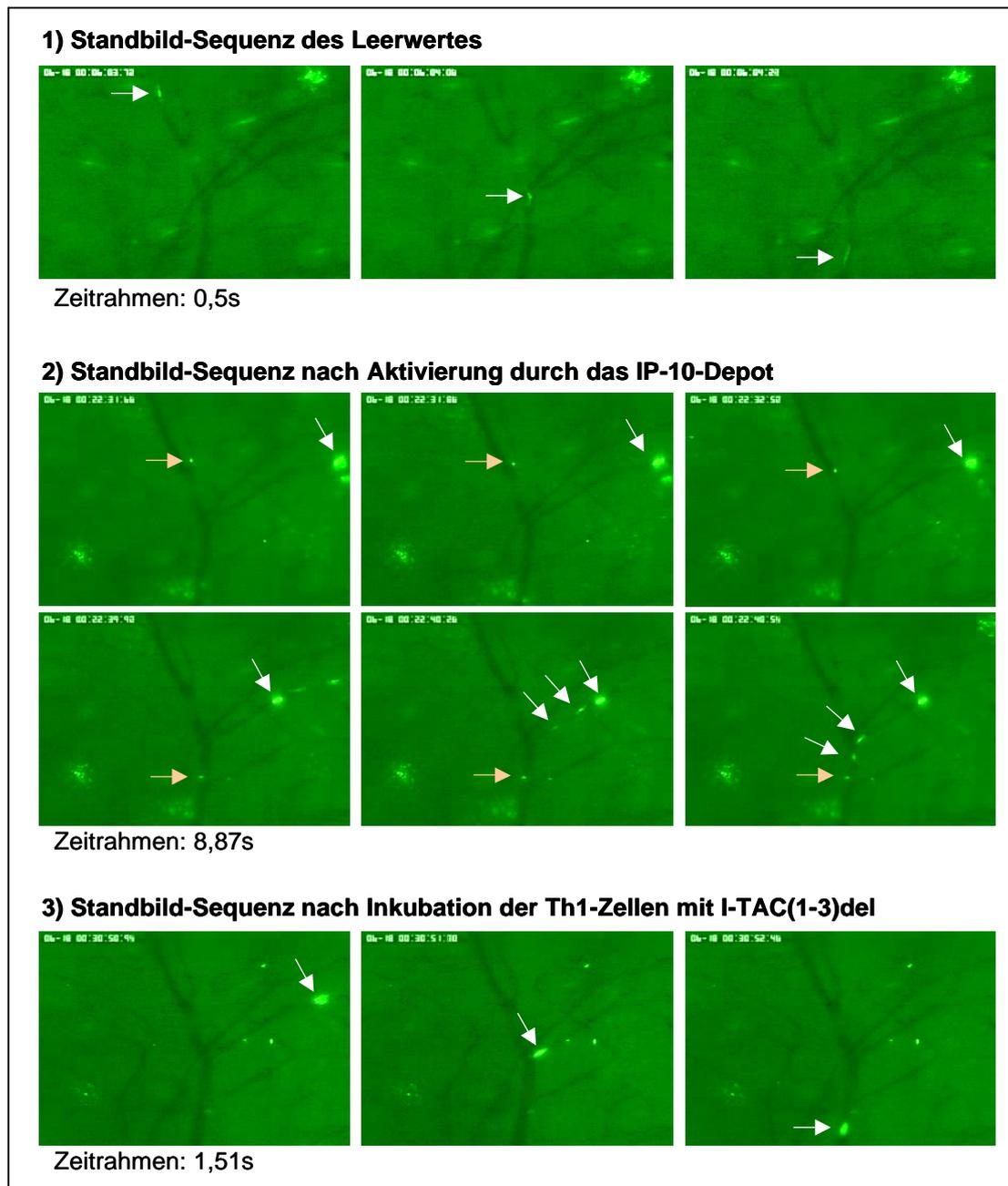
Das Rollen und kurzfristige Adhärenzen an der Blutgefäßwand ist, wie in der Einleitung beschrieben, der initiale Schritt bei der Auswanderung von Leukozyten aus dem Blutstrom zum Ort der Entzündung. Er wird durch Integrine vermittelt und beschreibt die Verlangsamung der im Blutstrom schwimmenden Leukozyten durch transiente Adhäsion am Endothel, dem anschließend die feste Adhäsion und später die Transmigration folgen kann. Mit der Intravitalmikroskopie sollte das Rollverhalten von exogen verabreichten, Fluoreszenzmarkierten Th1F12-Zellen ohne Stimulus (Leerwert), nach Gabe von IP-10/CXCL10 (Aktivierung) und nach Vorinkubation der Zellen mit dem Antagonisten I-TAC(1-3)del (Hemmung) untersucht werden.

Dazu wurde eine 6-8 Wochen alte C57Bl/6-Maus, wie in Methoden beschrieben und abgebildet, vorbereitet.  $1 \times 10^7$  unter Normalbedingungen kultivierte Th1F12-Zellen (5ng/ml rhIL-2) wurden wie beschrieben gefärbt (siehe Methoden).

Die Fluoreszenz-gefärbten Zellen wurden der Maus injiziert (200µl) und das basale Rollverhalten der T-Zellen über einen Zeitraum von zehn Minuten mittels Videokamera aufgezeichnet. Rollende und nicht rollende Zellen wurden über den Zeitraum des jeweiligen untersuchten Parameters gezählt.

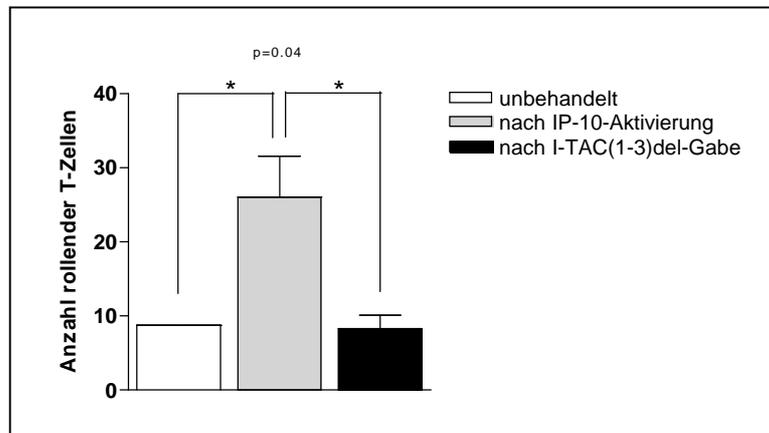
Nach Setzen des IP-10-Depots im linken Mausohr und anschließender mehrmaliger Injektion weiterer Th1-Zellen wurde ein verstärktes Rollen der Th1-Zellen in drei Gefäßen über einen Zeitraum von 20 Minuten beobachtet. Nach dem Spülen mit isotonischer Kochsalz-Lösung wurden der Maus als finaler Parameter I-TAC(1-3)del-vorinkubierte Th1-Zellen injiziert. Es konnte über 10 Minuten ein vermindertes Rollverhalten der Th1-Zellen in den Gefäßen des Mausohrs beobachtet werden.

**Abbildungen 3-38** zeigt exemplarisch für einen Versuch eine zeitliche Abfolge von Standbildern, die das Rollverhalten der Th1-Zellen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten verdeutlichen.



**Abb. 3-38: Standbild-Sequenzen des Rollverhaltens von Fluoreszenz-markierten Th1-Zellen in der Intravitalmikroskopie (IVM).** Erkennbar sind die venösen Gefäße des Mausohrs, die von oben nach unten durchströmt werden und sich aus einigen Verzweigungen zu einem Hauptgefäß vereinen. Gezeigt sind jeweils Bildabfolgen des Rollverhaltens von Th1-Zellen des Leerwertes, nach Aktivierung durch IP-10 und nach Vorinkubation mit I-TAC(1-3)del. Der Zeitrahmen umfasst die jeweiligen Sequenzbilder eines Parameters. Die Pfeile markieren sich im Blutfluss bewegende Th1-Zellen in verschiedenen Gefäßverzweigungen. Unbewegliche und unscharfe fluoreszierende Punkte sind einerseits zirkulierende Th1-Zellen in anderen Ebenen des Mausohrs oder andererseits auch Haare des Mausohrs.

**Abbildung 3-39** fasst das Ergebnis der Intravitalmikroskopie zusammen. Zur Auswertung der IVM wurden die rollenden und nicht rollenden Th1-Zellen in drei geeigneten venösen Gefäßen des Mausohrs ausgezählt. Wichtig dabei war, dass die Verlangsamung der Th1-Zellen im Blutfluss nicht aufgrund von Kreislaufproblemen der Maus zustande kam.



**Abb.: 3-39: Einfluss von IP-10/CXCL10 und I-TAC(1-3)del auf das Rollverhalten von Th1-Zellen.** Die Anzahl der rollenden Zellen wurde nach Setzen des IP-10-Depots und nach Antagonisten-Gabe ermittelt. Drei Gefäße wurden dafür ausgewertet und statistisch dargestellt. Die Signifikanz ist  $\pm$ SD dargestellt, \*:  $p=0,04$ .

Das Ergebnis der Intravitalmikroskopie zeigte, dass das Setzen des IP-10-Depots im Mausohr ein deutlich gesteigertes Rollverhalten der injizierten Th1-Zellen gegenüber dem Leerwert ( $201,5 \pm 38\%$ ) zur Folge hatte. Die Zellen konnten durch die intrakutane IP-10-Gabe und der anschließenden Verteilung von IP-10 im Mausohr aktiviert werden und gingen einen engeren Kontakt mit den Zellen des Venenendothels ein. Die Vorinkubation der Th1-Zellen mit I-TAC(1-3)del und anschließende Injektion dieser Zellen bewirkte eine starke Inhibition dieses zuvor durch IP-10 gesteigerten Rollverhaltens um  $205,4\% \pm 39,2\%$ .

Zusammenfassend wurde durch die Anwendung der Intravitalmikroskopie gezeigt, dass das *Pichia*-generierte I-TAC(1-3)del in der Lage war, *in vivo* das durch IP-10-vermittelte, verstärkte Rollverhalten von Th1-Zellen signifikant ( $p=0,04$ ) zu inhibieren. Dieses Ergebnis unterstreicht die Funktionalität des generierten Chemokinrezeptor-Antagonisten und dessen therapeutische Einsatzmöglichkeiten im Hinblick auf inflammatorische Krankheitsmodelle.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der T-Helfer-1-Zellklon, IF12, der in der Lage ist, *in vivo* eine schwere Nephritis in SCID-Mäusen auszulösen (Radeke et al., 2002) hinsichtlich seines Chemokinrezeptorprofils charakterisiert. Dazu wurde die Chemokinrezeptor-Expression und -Regulation auf RNA-Ebene mittels RT-PCR und cDNA-Array untersucht. Die für die Antagonistenstudien wichtigen Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5 und CXCR3 wurden durch FACS-Analyse auf der Oberfläche der Th1IF12-Zellen nachgewiesen. Dieser Zellklon wurde für alle funktionellen Experimente zu den Antagonisten als auch für Untersuchungen zur CXCR3-Signaltransduktion als Zellmodell verwendet.

Ziel der Arbeit war es, drei verschiedene Chemokinrezeptor-Antagonisten in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* zu exprimieren, aufzureinigen und deren Wirkung auf die Th1IF12-Zellen zu charakterisieren.

Die Herstellung der Antagonisten MCP-1(1-8)del und vMIP-II, erfolgte in Vorarbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). Die Generierung des Antagonisten I-TAC(1-3)del wurde im Rahmen der Masterarbeit von Frau Dipl.-Ing. E. Werner im *pharmazentrum* durchgeführt. Nach erfolgreicher Herstellung und Expression der Antagonisten in *Pichia pastoris*, sollten die Antagonisten aufgereinigt und in hohen Mengen gewonnen werden, um eine *in vitro*-Charakterisierung sowie den späteren Einsatz *in vivo* zu ermöglichen. Die Aufreinigung der Antagonisten wurde mit guter Reinheit durch die Heparin-Affinitätschromatographie erreicht. Die Ausbeuten an gereinigtem Protein waren jedoch zu gering, um größere, für die *in vivo*-Anwendungen nötigen, Mengen an einsetzbaren Antagonisten zu erzielen (siehe Aufreinigung der Muteine).

Die *in vitro*-Charakterisierung der drei Chemokinrezeptor-Antagonisten MCP-1(1-8)del, vMIP-II und I-TAC(1-3)del ergab, dass durch Expression in *Pichia* und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie funktionell bioaktive und spezifische Antagonisten generiert wurden, die in der Lage waren, die Liganden-spezifische Th1-Migration signifikant zu blockieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Kombination von zwei Chemokinen zu einer signifikanten Steigerung der Th1-Chemotaxis führte, die durch simultane Blockade mit zwei Chemokinrezeptor-Antagonisten wiederum deutlich inhibiert wurde.

Experimente zur Signalweiterleitung durch den Rezeptor CXCR3 bestätigten eine I-TAC-induzierte Internalisierung von CXCR3, eine gesteigerte Th1-Chemotaxis und eine I-TAC-induzierte Kalzium-Mobilisierung in Th1-Zellen. Der Einsatz von Pertussis-Toxin (PTX) auf die I-TAC-vermittelte Signaltransduktion von CXCR3 führte zu einer verminderten CXCR3-Oberflächenexpression, einer vollständigen Inhibition der Th1-Migration und einer Blockierung der Kalzium-Mobilisierung. Die Verwendung des Jak-Inhibitors AG490 zeigte keinen Einfluss auf die I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung, führte überraschenderweise zu einer signifikant gesteigerten Th1-Migration und einem anhaltenden Kalziumsignal.

In der Intravitalmikroskopie, einer *in vivo*-Anwendung zur Untersuchung der Leukozytenmigration in Gefäßen des Mausohrs, konnte ein durch ein IP-10/CXCL10-Depot hervorgerufenen gesteigertes Rollverhalten exogen applizierter Th1-Zellen, durch I-TAC(1-3)del blockiert werden. Dieses Experiment zeigt das therapeutischen Potential der in *Pichia* generierten Chemokinrezeptor-Antagonisten nicht nur *in vitro*, sondern auch in der Anwendung in *in vivo*-Krankheitsmodellen.

## 4.1 Charakterisierung der verwendeten Zelltypen

### Charakterisierung des Th1F12-Zellklons

Der Th1-Zellklon wurde für die funktionellen Untersuchungen der generierten Antagonisten verwendet und wurde hinsichtlich seines Chemokinrezeptorprofils untersucht. Da das Chemokinrezeptorprofil von Zellen aufgrund ihres Differenzierungszustandes und Stimulationszustandes variiert, wurden die Th1F12-Zellen unstimuliert, also nur mit humanem Interleukin-2 kultiviert, oder mit Concanavalin A (ConA) stimuliert, verwendet.

Die Charakterisierung hinsichtlich des Chemokinrezeptorprofils erweiterte und bestätigte die in Vorarbeiten erhaltenen Ergebnisse zum Typ des Th1F12-Klons (Radeke et al., 2002). Die Expression von Rezeptoren, wie CCR2, CCR5 und CXCR3, die hauptsächlich bei Th1-vermittelten Immunantworten eine Rolle spielen, das Fehlen der CCR3-Expression sowie die Expression des Chemokinrezeptors CCR7, weisen eindeutig auf eine T-Helfer-1-Zelle des *central memory*-Typs hin. Dies wird vor allem durch die Ergebnisse des cDNA-Arrays vor und nach ConA-Stimulierung deutlich. *Central memory* T-Zellen besitzen gegenüber naiven T-Zellen eine breitere migratorische Kapazität und benutzen zusätzlich zu CCR7 noch CXCR4, um zu den Lymphknoten zu wandern. Weiterhin exprimieren sie Chemokinrezeptoren wie CCR4, CCR5 und CXCR3 (Sallusto et al., 2004). Der cDNA-Array bestätigte eine CXCR4-Expression und eine rapide Heraufregulation von CCR4 nach Aktivierung, während Rezeptoren wie CCR5 daraufhin selektiv herunterreguliert wurden. (Sallusto 2004). Zudem konnte eine nach Aktivierung gesteigerte Expression von CCR4, CCR6, CCR10 sowie eine konstitutive Expression von CCR8 beobachtet werden. Diese Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Migration von T-Zellen in die Haut. Da der Th1F12-Klon durch subkutane Immunisierung von Mäusen hergestellt wurde, könnte die gesteigerte Expression dieser in der Haut wichtigen Chemokinrezeptoren eine direkte Folge dieser lokalen Immunisierung sein.

## Charakterisierung weiterer Zelltypen

In einer weiteren Charakterisierung wurde das Chemokinrezeptorprofil von unreifen dendritischen Zellen (XS52) und murinen Mastzellen (BMMC) untersucht. Auch hier zeigte sich für die DCs, übereinstimmend mit den Befunden aus der Literatur, eine Expression der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5 und CCR6. Hingegen konnte keine Expression für CCR3 und CCR7 nachgewiesen werden. Die Expression von CXCR3 war bei einer relativ hohen Zyklenzahl von 35 PCR-Zyklen äußerst schwach bis gar nicht vorhanden. Es wurde gezeigt, dass unreife humane Langerhans-Zellen weder CCR7 noch CXCR3 und nur teilweise CCR3 exprimieren. In Folge der Reifung von Dendritischen Zellen durch Antigenkontakt ändert sich dieses Expressionsprofil in soweit, dass Rezeptoren wie CCR1, CCR2, CCR5 und teilweise CCR6 herunterreguliert werden, während CCR7 für die Migration zu den Lymphknoten wieder benötigt wird (Dieu-Nosjean et al., 1999). Das Profil der murinen Mastzellen zeigte eine konstitutive Expression der Rezeptoren CCR2, CCR3, CCR5 und CCR6, während CCR7 und CXCR3 nicht detektiert wurden. Für eine genauere Analyse des Chemokinrezeptorprofils der beiden Zelltypen würde sich eine cDNA-Array-Analyse anbieten.

## 4.2 Herstellung und Aufreinigung der Chemokinrezeptor-Antagonisten MCP-1(1-8)del, vMIP-II und I-TAC(1-3)del

Im folgenden Abschnitt wird auf wichtige Teilergebnisse und Schwierigkeiten in der vorliegenden Arbeit eingegangen. Ein wesentlicher Faktor, der die Verwendung der in *Pichia pastoris* exprimierten Antagonisten für insbesondere die *in vivo*-Anwendungen limitierte, war die sich sehr schwierig gestaltende Aufreinigung der Muteine.

### Herstellung und Expression der Muteine

#### *Expression in Pichia pastoris*

Die Herstellung der Chemokinrezeptor-Antagonisten erfolgte mit Hilfe des Expressionssystems *Pichia pastoris*. Diese methylophile Hefe weist im Vergleich mit der Herstellung in z.B. *E.coli* einige Vorteile auf. Zum einen bedürfen die meisten eukaryotischen Proteine posttranslationaler Modifikationen, um in korrekter Weise, hinsichtlich ihrer Struktur (Disulfidbrücken), ihrer Sekretion (Glykosylierungen) und ihrer Bioaktivität, exprimiert zu werden. Prokaryotische Expressionssysteme wie *E.coli* sind dazu nicht in der Lage und reduzieren so die Wahrscheinlichkeit der funktionellen Herstellung dieser Proteine. Zum

anderen ergaben sich bereits in der Vergangenheit Aufreinigungs- und Isolierungsprobleme bei der Expression rekombinanter Chemokine in *E.coli* durch Formation von so genannten *inclusion bodies* (siehe Dissertation Dr. M. Wahl, 1998). Weitere Vorteile bei der Kultivierung von *Pichia pastoris* sind die einfache Handhabung, die geringen Kultivierungskosten, die hohe Effizienz der Sekretion aufgrund starker Promotoren und die Möglichkeit einer Hochzelldichte-Kultivierung in großen Bioreaktoren.

Die Chemokinrezeptor-Antagonisten wurden ohne eine Aufreinigungshilfe (*tag*) in den pPIC9(K) Expressionsvektor kloniert. Dies wurde im Hinblick auf den möglichen Bioaktivitätsverlust des generierten Chemokins durchgeführt. Da der N-Terminus essentiell für die antagonistische Aktivität der Muteine ist, wäre nur ein Anhang am C-Terminus möglich. Es ist aus der Literatur bekannt, dass dieser Teil des Proteins jedoch wichtig für die Bindung an Glukosaminoglykane der EM und das Bindungs-/Lösungsverhalten des Proteins ist, so dass davon bewußt Abstand genommen wurde (Baggiolini, 1997).

Die Herstellung in *Pichia* ermöglicht, wie bereits erwähnt, die Generierung von Mut<sup>+</sup>- oder Mut<sup>S</sup>-Stämmen. Mut<sup>+</sup>-Transformanten benötigen sehr hohe Mengen an Methanol in der Induktionsphase. In der Hochzelldichte-Kultivierung können diese Mengen an Methanol eine Gefahr wegen der Brennbarkeit darstellen. Mut<sup>S</sup>-Transformanten können daher bevorzugt eingesetzt werden, um die Menge an Methanol zu verringern. Zwei der generierten Antagonisten, MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del, wiesen den erwünschten Mut<sup>S</sup>-Phänotyp auf, während das virale MIP-II dem Mut<sup>+</sup>-Phänotyp entsprach. In dieser Arbeit wurde die Expression von vMIP-II mit einem festgelegten Klon aus Hannover (MHH) durchgeführt und der Phänotyp nachträglich ermittelt. Es konnte in der Hochzelldichte-Kultivierung aufgrund dessen eine erhöhte Proliferation von vMIP-II in Methanol-haltigem Medium festgestellt werden. Mut<sup>S</sup>-Stämme tragen nur noch das AOX2-Gen und tolerieren nur geringe Mengen an Methanol. Diese Limitierung kann durch Zugabe von weiteren Kohlenstoffquellen wie Sorbitol, Mannitol, Trehalose oder Alanin umgangen werden (Inan et al., 2000). In dieser Arbeit wurde die Expression der Proteine ausschließlich mit Methanol durchgeführt. Möglicherweise würde ein Zusatz oben genannter Kohlenstoffquellen in eine optimalere Produktionsausbeute resultieren.

Verschiedenste Proteine wurden in der Vergangenheit mit unterschiedlichem Erfolg in *Pichia pastoris* hergestellt (Daly, 2004). Die Produktausbeute an gewünschtem Protein kann zusätzlich zu den oben genannten Faktoren noch vom Expressionssystem an sich abhängen. Es wurde beobachtet, dass bei der Expression von nicht-Hefe-Peptiden in *Pichia* die Kodons des Gens, welches das Protein kodiert, nicht optimal für eine hohe Expressionsrate des Proteins angepasst sein können. So kann es zu einer verringerten Expression des Zielproteins kommen, weil die Menge an bestimmten Aminoacyl-tRNAs in

der Hefe limitiert sind (Romanos et al, 1992). Es wurde ebenso beobachtet, dass es zu einer vorzeitigen Termination der Translation durch Abwesenheit der spezifischen tRNAs kommen kann (Eckart et al., 1996) und, dass es zu einer Termination der Transkription bei einem hohen AT-Gehalt der DNA kommen kann (Sreerikshna et al., 1997).

### *Signalsequenzen*

Die Prozessierung der in *Pichia* hergestellten Proteine kann mit der von der *S. cerevisiae* stammenden  $\alpha$ -Faktor Prepro-Signalsequenz ( $\alpha$ -F) und/oder der Protein-eigenen Signalsequenz erfolgen. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurden alle Antagonisten mit der  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz von *Pichia* ohne eigene Signalsequenz exprimiert. Die  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz umfasst ein 19 Aminosäuren langes Signalpeptid (Pre-Sequenz), gefolgt von einer 60 Aminosäure langen Pro-Region. Bei der Translation wird die Signalsequenz durch eine Signalpeptidase entfernt und die Spaltstelle der Pro-Region durch die Kex2-Protease erkannt. Insgesamt sieben Expressionsstudien in *Pichia* zeigten, dass die Prozessierung der generierten Proteine zu einer unerwünschten N-terminalen Verlängerung mit Glu-Ala-Wiederholungen führte (zusammengefasst von Daly, 2004). Diese EAEA-Verlängerung wurde auch bei der N-terminalen Sequenzierung von MCP-1(1-8)del festgestellt. Kritisch wird eine solche ungewollte Verlängerung z.B. im Falle der in dieser Arbeit hergestellten Chemokinrezeptor-Antagonisten, wenn sie Aminosäuren des nativen Proteins, die eigentlich deletiert wurden, ersetzen. Dies war für MCP-1(1-8)del jedoch nicht der Fall, so dass ein funktioneller Chemokinrezeptor-Antagonist gewonnen wurde. Eine mögliche Erklärung für eine solche N-terminale Aminosäureverlängerung liegt evtl. in der Unfähigkeit der STE13-Protease, die für die Abspaltung der Glu-Ala- (EA-) Wiederholungen verantwortlich ist, die hohe Menge an rekombinantem Protein zu prozessieren, so dass N-terminal variierende Enden entstehen.

### *Immunreaktivität und Molekulargrößen*

Die korrekte Größe der in *Pichia* generierten Chemokinrezeptor-Antagonisten, MCP-1(1-8)del, vMIP-II und I-TAC(1-3)del wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse untersucht. In allen drei Fällen konnte ein für das rekombinante Protein spezifischer Antikörper die Immunreaktivität des jeweiligen Antagonisten bestätigen.

Einige Chemokine bilden in Anwesenheit von Glukosaminoglykanen (GAGs) Multimere aus. So wurde, wie zuvor erwähnt, die Struktur von gelöstem MCP-1/CCL2 und RANTES/CCL5 in der Literatur als Dimer und Tetramer beschrieben (Booth et al., 2002). Die Expression von MCP-1(1-8)del zeigte in der Western-Blot-Analyse eine Bande bei etwa 13,5 kDa, welche

dem Monomer entspricht und auch durch die Aminosäure-Sequenzierung bestätigt wurde. Weitere Signale wurden bei etwa 30, 45 und 60 kDa detektiert und sprechen für Dimer-, Trimer- bzw. Tetramerbildung von MCP-1(1-8)<sub>del</sub>. Posttranslationale Modifikationen wie N-Glykosylierungen, die zu einer Erhöhung des Molekulargewichts beitragen können, konnten durch einen Glykosidase-F-Verdau für MCP-1(1-8)<sub>del</sub> nicht bestätigt werden.

Die Western-Blot-Analyse der Expression von vMIP-II ergab eine Bande bei etwa 8-9kDa, was dem Monomer des Proteins entspricht. Eine zweite dominante Bande wurde bei etwa 16kDa detektiert und könnte die Dimerform von vMIP-II darstellen. Versuche, die ersten N-terminalen Aminosäuren von vMIP-II zu sequenzieren, ergaben aufgrund von Überlagerungen von 2-3 Proteinen keine eindeutige Aminosäuresequenz für vMIP-II durch Herrn Dr. Heid (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg).

Massenspektrometrische Untersuchungen von synthetisch hergestelltem vMIP-II in der Literatur beschreiben es in der aktiven, gelösten Form als Monomer (Liwang et al., 1999). Dies steht im Kontrast zu den in dieser Arbeit ermittelten Molekülgrößen im Western-Blot. Es ist jedoch vorstellbar, dass das durch ein eukaryotisches Expressionssystem hergestellte vMIP-II, welches in das *Pichia*-Medium sekretiert wird und dort an Trägermoleküle gebunden werden kann, wie für andere Chemokine beschrieben, oligomerisiert. Eine weitere Untersuchung zum Vergleich der Struktur von vMIP-II mit Chemokinen wie RANTES und MCP-3 ließ keine eindeutigen Schlüsse über die Quartärstruktur von aktivem vMIP-II zu. Es wird darin gezeigt, dass vMIP-II als Dimer kristallisiert und, dass eine Oligomerisierung durchaus vorstellbar ist (Fernandez et al., 2000). Die Durchführung eines Glykosidase-F-Verdau zur Analyse evtl. vorliegender N-Glykosylierungen fiel negativ aus. Dieses Ergebnis konnte zudem später durch theoretische Untersuchungen einer Proteindatenbank (SwissProt) bestätigt werden.

Die Western-Blot-Analyse von I-TAC(1-3)<sub>del</sub> zeigte eine einzige Bande bei etwa 9kDa, was der monomeren Form des Proteins entspricht. Eine Oligomerisierung konnte bei keinem anderen Blot beobachtet werden. Während für IP-10 in der Literatur gezeigt wurde, dass es in Lösung als Dimer vorzuliegen scheint (Booth et al., 2002), wurde eine Oligomerisierung für I-TAC bisher nicht beschrieben. Ein durchgeführter Glykosidase-F-Verdau konnte keine N-Glykosylierungen detektieren. Zudem fiel die theoretische Analyse zu möglichen O-Glykosylierungsstellen bei I-TAC(1-3)<sub>del</sub> negativ aus.

### **Aufreinigung der Muteine**

Die gewünschten Antagonisten wurden aus relativ großen (6-28 Liter) und unkonzentrierten (3-200µg/ml Zielprotein) Mengen Kulturüberstand aufgereinigt. Mit dem geringen Durchsatz an zu verarbeitendem Überstand, limitiert durch kleine Filtrationseinheiten und FPLC-Säulen,

konnte eine zufrieden stellende Aufreinigung der Muteine nur in kleinen Mengen erzielt werden. Der Wunsch, große Vorräte mit einer definiert gleich bleibenden Konzentration an dem jeweiligen Antagonisten zu generieren, konnte in dieser Arbeit nicht verwirklicht werden. Die Gründe dafür werden in den folgenden Abschnitten erörtert.

#### *Ionenaustausch-Chromatographie*

Zunächst wurde die Aufreinigung der Antagonisten mittels Kationenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Wie bereits erwähnt, weisen die meisten Chemokine einen hohen isoelektrischen Punkt (pI) auf (9-11), der diese Art der Reinigung ermöglichen sollte. Die Ionenaustausch-Chromatographie wurde im *batch*-Verfahren, also mit freien *Beads* (Trägermoleküle) im Gefäß, bei verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt. Trotz empfohlener Pufferbedingungen, konnte die Aufreinigung der Antagonisten nicht erfolgreich durchgeführt werden. Eluierte Proteinmengen waren zu gering, um mit dem spezifischen ELISA detektiert zu werden. Ein Grund könnte hierfür sein, dass durch die stetige Bewegung keine optimale Ladungsinteraktion zwischen den Molekülen hergestellt werden konnte bzw. diese nur transient bestand. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Muteine durch Proteasen zügig abgebaut und degradiert wurden. Die theoretischen Analysen durch das Proteindatenbank-Programm ExPASy wiesen mMCP-1 und ml-TAC eine Halbwertszeit von zehn und drei Minuten in der Hefe zu und deklarierten ml-TAC als nicht stabiles Protein. Da bei der Aufreinigung keine Protease-Inhibitoren verwendet wurden, könnte dies ein möglicher Grund für den Proteinverlust darstellen. Eine Optimierung dieser Methode könnte die FPLC-gesteuerte Ionenaustausch-Chromatographie darstellen, bei der die Probe über eine statische Austauscher-Säule gegeben wird und die zuvor geschilderte Problematik entfällt. Zudem könnte der Zusatz von Protease-Inhibitoren eine vorzeitige Degradation des Muteins verhindern.

#### *Heparin-Affinitätschromatographie*

In der Literatur wurde gezeigt, dass Chemokine an gereinigte Fraktionen von Heparin *in vitro* binden (Witt et al., 1994) und auch an natürlich vorkommende GAGs wie Heparansulfat und Chondroitinsulfat der EM und der Oberfläche von Endothelzellen (Luster et al., 1995; Hoogewerf et al., 1997; Koopmann et al., 1999). Die Affinität zu Heparan und Heparan-ähnlichen Molekülen ist jedoch variabel. Zum einen hängt sie vom Heparan-Typ ab und zum anderen von individuellen Aminosäureresten, die sich in der Matrix-bindenden Domäne jedes Chemokins befinden. Für einige Chemokine, wie MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 oder IL-8/CXCL2, konnten die individuell für die Matrixbindung wichtigen Aminosäuren identifiziert werden (Chakravarty et al., 1998; Campanella et al., 2003; Kuschert et al., 1998). Zusätzlich spielt ein klassisches BBXB-Motiv bei einigen Chemokinen wie z.B. RANTES/CCL5, MIP-

1 $\alpha$ /CCL3 und SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 eine wichtige Rolle (Proudfoot et al., 2001; Laurence et al., 2001).

Die sauberste Aufreinigung der Antagonisten wurde mittels Heparin-Affinitätschromatographie erzielt. Eine Vereinfachung der Aufreinigungsprozedur mit Hilfe der Lyophilisierung und anschließender Filtration führte im Falle von I-TAC(1-3)del zu einer nicht optimalen Sauberkeit des Antagonisten und bewirkte deutliche Nebeneffekte (siehe unten). Durch die Heparin-Affinitätschromatographie konnten nur kleine Mengen an optimal gereinigtem Antagonisten erzielt werden. Diese Mengen (0,5-10 $\mu$ g/ml) waren ausreichend, um die *in vitro*-Charakterisierung der Antagonisten durchzuführen. Für den Einsatz in einem *in vivo*-Krankheitsmodell waren diese Konzentrationen jedoch limitierend.

Ein Grund für die erfolgreichere Reinigung der Antagonisten mit der Heparin-Affinitätschromatographie gegenüber der Ionenaustausch-Chromatographie mag in der Eigenschaft liegen, dass immobilisiertes Heparin zwei Wirkungsweisen besitzt. Zum einen wirkt es wie ein Ionenaustauscher über die Ladungsinteraktion mit seinen Sulfatgruppen, zum anderen vermittelt es spezifische Interaktionen über die Bindungsmotive und speziellen Aminosäuren der Chemokine (siehe oben).

Die Ausbeute an sauberem Antagonisten war mit einem Proteinverlust zwischen Faktor 1000 und 10.000 verbunden. Besondere Schwierigkeiten ergaben sich mit jedem hinzukommenden Aufreinigungsschritt, wodurch hohe Mengen an spezifisches Mutein oder dessen Bioaktivität verloren ging. Im Umgang mit I-TAC(1-3)del führte das Einfrieren und Auftauen des Proteins oder die Erhöhung des pH-Wertes in den physiologischen Bereich zu einem irreversiblen Ausfällen des Proteins. Versuche, den pH-Wert durch langsames Austauschen des Puffers gegen PBS oder RPMI-Medium (Filtration, Dialyse) in den physiologischen Bereich anzuheben, resultierten in Verlust des Proteins bzw. Verlust dessen Bioaktivität. Theoretische Berechnungen der Proteindatenbank ExPasy zur Halbwertszeit von I-TAC(1-3)del ergaben  $T_{1/2} = 3\text{min}$  und schienen die Instabilität des Muteins zu untermauern.

Neben der Instabilität, die speziell bei Hefe-exprimiertem I-TAC(1-3)del zugrunde liegt, sind die weiteren Gründe, die zu einer nur sehr geringen Ausbeute an gewünschtem Zielprotein mittels Heparin-Affinitätschromatographie geführt haben, noch ungeklärt. Einerseits weisen alle verwendeten Antagonisten bzw. deren Wildtypformen Matrix-bindende Domänen und individuelle Aminosäuren für die Bindung an Heparan-ähnliche Moleküle auf (siehe oben). Für IP-10 ist z.B. eine hohe Affinität zu Heparin nachgewiesen (25nM). Vergleicht man die für diese Bindung wichtigen Aminosäuren von IP-10/CXCL10 mit I-TAC/CXCL11, so kommen diese Aminosäuren in I-TAC nicht vor (Campanella et al., 2003). Ein Grund für die geringe Affinität zur Heparinsäule könnte demnach das Nichtvorhandensein dafür wichtiger

Aminosäuren sein. (siehe Optimierung der Aufreinigung). Ein anderer Grund könnte das Expressionssystem *Pichia pastoris* selbst sein. Wie bereits erwähnt sekretiert *Pichia* eigene Proteine sowie das gewünschte Zielprotein in das Kulturmedium. Dabei könnten durch *Pichia* exprimierte Trägerproteine die Muteine binden und in ihrer Eigenschaft beeinflussen. Zum einen könnten sie an das Mutein gebunden, die Gesamtnettoladung des Muteins und damit seine Interaktion mit anderen Molekülen verändern oder unterbinden. Zum anderen könnten für die Heparinbindung wichtige Aminosäuren von gebundenen *Pichia*-Proteinen verdeckt werden, so dass eine Interaktion mit der Heparinsäule nur schwer möglich wäre bzw. eine Verdrängung der Proteine durch das Heparin der Säule nicht stattfindet.

#### *Aufreinigung durch Lyophilisierung und Filtration*

Zwischenzeitlich wurde die Aufreinigung von I-TAC(1-3)<sub>del</sub> mittels Lyophilisierung und Filtration durchgeführt. In der SDS-PAGE zu I-TAC (1-3)<sub>del</sub> zeigte sich, dass nur wenige *Pichia*-eigene Proteine in den Überstand sezerniert wurden, die hauptsächlich bei einem Molekulargewicht über 45kDA auftraten. Daher wurde eine Aufkonzentrierung des Überstandes mit anschließender Größenausschluss-Filtration angewandt. Proteine, die größer als 30kDA waren, wurden mittels Centriprep-Filtern abgetrennt. Generell bewies sich die Lyophilisierung als sehr effektive Methode zur Protein-Aufkonzentrierung.

Es zeigte sich im Laufe der folgenden Experimente, dass diese Aufreinigung von I-TAC(1-3)<sub>del</sub> suboptimal war. Die im Chemotaxis-Assay ermittelte Inhibition des nicht Heparin-gereinigten I-TAC(1-3)<sub>del</sub> auf die Th1-Migration war übermäßig dominant, und auch der in der gleichen Weise aufbereitete Leervektor-Überstand zeigte inhibitorische Effekte.

Bei der Anwendung des auf diese Weise gereinigten I-TAC(1-3)<sub>del</sub> in der Intravitalmikroskopie wurde, ausgenommen beim ersten Experiment, das Sterben der Versuchstiere beobachtet. Neben der suboptimalen Reinigung des Antagonisten können allerdings noch andere Ursachen für das Sterben der Mäuse zugrunde liegen (siehe Intravitalmikroskopie).

#### *Optimierung der Aufreinigung*

Die Probleme, die sich bei der Aufreinigung der Chemokinrezeptor-Antagonisten aus dem *Pichia*-Medium ergaben, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht behoben werden. Es wurde jedoch für die Isolierung von Proteinen gezeigt, dass das Anhängen einer Aufreinigungshilfe (*His-tag*) zu einer vereinfachten Reinigung des gewünschten Proteins führen kann (Prinz et al., 2004).

Diese Überlegung wurde bei der neuen Klonierung eines vierten Chemokinrezeptor-Antagonisten gegen den Rezeptor CXCR4 mit einbezogen. Das Anhängen eines *His-tags* sollte bei dieser Methode in eine einfachere Aufreinigung des Muteins mittels Nickelsäule

resultieren. Zudem sollte mit dieser Methode eine Unabhängigkeit von der variablen Bindungsaffinität zu verschiedenen Heparintypen erzielt werden.

### 4.3 Funktionelle Untersuchungen zur Wirkung der Antagonisten

#### Therapeutische Strategie der Chemokinrezeptor-Blockade

Die Intervention durch Chemokinrezeptor-Blockade stellt einen viel versprechenden Ansatzpunkt bei der Intervention entzündlicher Krankheiten dar, da es sich um eine molekulare Schaltstelle zwischen verschiedenen Signalwegen handelt. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass durch Einsatz spezifischer Antagonisten eine Verbesserung entzündlicher Krankheiten erzielt wurde. Dabei wurde die wichtige Funktion des N-Terminus von Chemokinen für die Rezeptorbindung und -aktivierung erkannt, und es wurden N-terminal modifizierte Chemokine generiert, die potente Chemokinrezeptor-Antagonisten darstellten. 1997 zeigte die Gruppe um Gong, dass chemisch synthetisiertes, N-terminal deletiertes MCP-1, MCP-1(9-76), das Fortschreiten einer entzündlichen Arthritis im MRL-*lpr* Maus-Modell verhinderte. Ebenso konnte der Einsatz zweier N-terminal veränderter Formen von RANTES, Met-RANTES und AOP-RANTES, eine Verbesserung der Symptome in der Immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis erzielen (Proudfoot et al., 1996; Lloyd et al., 1997).

#### Chemokinrezeptor-Blockade der generierten Antagonisten

Um die antagonistische Wirkung der hergestellten Muteine zu analysieren, wurde die spezifische Liganden-induzierte Migration des Th1-Zellklons im Chemotaxis-Assay untersucht.

Dazu wurde zunächst das chemotaktische Verhalten der Th1-Zellen gegenüber steigenden Konzentrationen an murinem MCP-1/CCL2 beobachtet. Das Ergebnis zeigte in einem Konzentrationsbereich von 5-72nM MCP-1/CCL2 einen glockenförmigen Kurvenverlauf (Gauß'sche Kurve) mit einer maximalen Migration bei 36nM und einem darauffolgenden Abfall der Migration zwischen 36 und 72nM MCP-1/CCL2. Daraufhin wurde die Konzentration, bei der eine maximale Migration der Zellen beobachtet wurde, als Basiswert für die Inhibition durch MCP-1(1-8)del gewählt. Der Antagonist war in der Lage, die MCP-1-induzierte Chemotaxis der Th1-Zellen Rezeptor-spezifisch zu inhibieren (58%). Dieses Ergebnis bestätigte die Expression eines funktionell bioaktiven CCR2-Antagonisten.

Virales MIP-II wurde als zweiter Breitspektrum-Antagonist in *Pichia* hergestellt. Wie bereits erwähnt ist vMIP-II ein Chemokin des Kaposi's Sarkom-assoziierten Herpes-Virus KSH/HHV8, ist in der Lage, sowohl CC- (CCR1, 2, 5) als auch CXC- (CXCR3, 4) Chemokinrezeptoren zu blockieren (Kledal et al., 1997) und ist dem Virus bei der Unterwanderung der Wirtsabwehr dienlich. Virales MIP-II besitzt zusätzlich noch agonistische Eigenschaften für den Rezeptor CCR3. Für die Untersuchung der Bioaktivität wurde zum einen murines MCP-1/CCL2 zum anderen humanes RANTES/CCL5 als selektive Agonisten für die Th1-Migration verwendet. Es zeigte sich, dass das generierte vMIP-II in der Lage war, sowohl die MCP-1/CCL2-induzierte als auch die RANTES-induzierte Th1-Chemotaxis deutlich zu blockieren (65% bzw. 72% Inhibition) und bestätigte wiederum die Funktionalität des generierten Muteins.

Vergleicht man die Konzentrationen von MCP-1(1-8)del und vMIP-II, zu einer 50%igen Migrationshemmung geführt haben, so wird deutlich, dass vMIP-II ein effektiverer Antagonist für die MCP-1-induzierte Th1-Migration ist. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass vMIP-II einen Breitspektrum-Antagonisten darstellt, der sowohl CC- als auch CXC-Chemokinrezeptoren blockiert. Wie durch die Charakterisierung von Th1IF12 nachgewiesen, exprimiert der Th1-Klon die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 als antagonistische Rezeptoren von vMIP-II, so dass von vMIP-II im Gegensatz zu MCP-1(1-8)del mehr als ein spezifischer Chemokinrezeptor simultan blockiert werden kann.

Die antagonistische Wirkung von I-TAC(1-3)del wurde hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung auf seine drei natürlichen Liganden IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9 und I-TAC/CXCL11 im Chemotaxis-Assay ermittelt. Es konnte durch die Stimulierung mit den CXCR3-Liganden eine charakteristische glockenförmige Verlaufskurve der dosis-abhängigen Th1-Migration beobachten werden, die unterschiedliche Migrationsmaxima erreichte. Die Konzentration, bei der I-TAC und MIG ihre maximale Chemotaxis vermittelten, lag um einen Faktor 10 kleiner als für IP-10. Dies bestätigte sich weiterhin in der Untersuchung zur CXCR3-Affinität der einzelnen Liganden. Es konnte der Befund aus der Literatur bestätigt werden, dass I-TAC/CXCL11 vor MIG/CXCL9 und IP-10/CXCL10 die höchste Affinität zu CXCR3 aufweist (Clark-Lewis et al., 2003). So zeigte eine vergleichende Ratio aus  $IC_{50}$ -Werten der I-TAC(1-3)del-Hemmung und der maximalen Migrationskonzentration, dass bei I-TAC (vor MIG und IP-10) die höchste Menge von I-TAC(1-3)del zur Verdrängung des Liganden vom Rezeptor benötigt wurde.

Die Gesamthemmung der Liganden-induzierten Migration reichte von 74% bei mMIG, 90% bei mIP-10 und 88% bei ml-TAC. Die  $IC_{50}$ -Werte, die sich aus der Hemmung der Liganden-induzierten Th1-Migration für I-TAC(1-3)del ergaben, bestätigten das Potential von I-TAC < MIG < IP-10.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Herstellung und Expression der Muteine in *Pichia pastoris* zu einer erfolgreichen Generierung von drei potenten spezifischen Chemokinrezeptor-Antagonisten geführt hat, deren therapeutisches Potential zukünftig in *in vivo*-Krankheitsmodellen untersucht werden sollte.

### **Chemokin- und Antagonisten-Kombinationen**

Der kombinatorische Einsatz von zwei Chemokinen und deren Effekte auf die Th1-Migration wurde im Hinblick auf die simultane Chemokinrezeptor-Blockade untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der kombinatorische Einsatz von MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10 sowie MCP-1/CCL2 und I-TAC/CXCL11 im Bereich niedrigerer Konzentrationen zu einer signifikant gesteigerten Th1-Migration im Chemotaxis-Assay führte. Bei den Kombinationen war zu beobachten, dass ab dem Konzentrationsbereich, bei dem die einzelnen Chemokine eine maximale Chemotaxis bewirkten, keine Migrationssteigerung beobachtet wurde. Ein Grund dafür könnte eine frühere Sättigung der Th1-Migration sein. Zudem könnten die Chemokinkombinationen eine Beeinflussung der Rezeptoren untereinander bewirken (heterologe Desensitivierung).

Durch die Kombination von zwei Chemokinrezeptor-Antagonisten sollte geklärt werden, ob eine effektivere Inhibition der Chemokin-induzierten Th1-Migration gegenüber der Einzelhemmung erzielt werden kann. Dazu wurde MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10 als gemeinsamer Basisstimulus verwendet und der kombinatorische Effekt von MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del untersucht. Die statistische Auswertung ergab eine signifikant gesteigerte Inhibition (10%) der Th1-Migration durch Kombination beider Antagonisten. Dieser Effekt schien in Einzelexperimenten nicht maßgeblich höher als die potente Inhibitionswirkung von I-TAC(1-3)del allein.

### **Kalzium-Mobilisierung in Th1-Zellen**

Die Kalzium-Mobilisierung wurde als zweiter funktioneller Test durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Chemokine ein Kalziumsignal in Th1-Zellen initiierten. Da der für die Zellen verwendete HBSS-Puffer jedoch ebenso zu einem Kalziumsignal führte, wurden diese Werte von den Kalziumsignalen der Chemokine abgezogen. Aufgrund der nicht ganz optimalen Methode konnten keine verlässlich reproduzierbaren Daten gewonnen werden. Die Messung wurde in einer 96-Lochplatte

mittels Fluoreszenz-Reader durchgeführt. Dabei war ein kontinuierliches Rühren der Zellsuspension, wie es bei der Verwendung von Quarzküvetten üblich ist, nicht möglich. Des Weiteren musste die Platte zwischen Ermittlung des Leerwertes und der anschließenden Zugabe des Stimulus aus dem Gerät gefahren werden, was einen zeitlichen Verlust zwischen Zugabe und der einsetzenden Fluoreszenzmessung bedeutete.

#### **4.4 Signalweiterleitung durch CXCR3**

##### *Kalzium*

Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Aktivierung durch CXCL9, 10 und 11 in eine Kalzium-Mobilisierung in T-Zellen resultiert (Loetscher et al., 1996; Rabin et al., 1999; Cole et al., 1998). Die Ergebnisse zur CXCR3-Signalweiterleitung zeigten, dass PTX die I-TAC-induzierte Kalzium-Mobilisierung hemmte, während bei AG490-behandelten Zellen eine anhaltende Kalziumantwort beobachtet werden konnte. Übereinstimmend mit der Literatur wurde kein inhibierender Effekt von AG490 auf die Kalziumantwort festgestellt (Constantin et al., 1999). Die molekularen Hintergründe, die zu dem verzögerten Abfallen des Kalziumsignals nach AG490-Behandlung führen, sind dabei noch unklar.

Generell wurde z.B. für die Bindung von RANTES an seinen Rezeptor CCR5 ein schneller und ein langsamer Kalziumeinfluss beschrieben. Frühe Kalziumsignale induzieren Kalzium, Rezeptor-Dimerisierung und Jak/STAT-Aktivierung, während die langsameren Signale zu Chemotaxis, Zellpolarisation und  $G\alpha_i$ -vermittelten Zellantworten führen (Neptune et al., 1997). Inhibitoren können dabei einen schnellen Kalziumeinfluss blockieren, den langsamen jedoch unbeeinflusst lassen (Frink M., Dissertation 2003, LMU München). Um die Signalweiterleitung über den CXCR3-Rezeptor detailliert untersuchen zu können, müssten sensitivere und qualitativ bessere Messmethoden angewandt werden.

##### *Internalisierung*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Internalisierung bestätigten Befunde aus der Literatur, bei denen konzentrationsabhängig eine Liganden-induzierte CXCR3-Internalisierung zu beobachten war. Es wurde für die humanen CXCR3-Liganden beschrieben, dass I-TAC vor IP-10 und MIG die effektivste Internalisierungsstimulus von CXCR3 ist (Sauty et al., 2001). Die Inkubation der Zellen mit PTX hatte keinen Einfluss auf die I-TAC-induzierte CXCR3-Internalisierung. Jedoch konnte eine reduzierte Oberflächenexpression von CXCR3 zum Anfangszeitpunkt beobachtet werden. Die Inkubation mit dem Jak-Inhibitor AG490 hatte keinen Einfluss auf die I-TAC-induzierte Internalisierung von CXCR3. Es wurde gezeigt, dass die CXCR3-Internalisierung aufgrund

von Proteinkinase C- (PKC-) Aktivierung erfolgt. Inhibitoren der PKC konnten die Liganden-induzierte CXCR3-Internalisierung jedoch nicht unterbinden; dies galt ebenso für Inhibitoren der PI3K (Wortmannin) und der Tyrosinkinase (Genestein) (Sauty et al., 2001). Wahrscheinlich ist ein anderer Weg, der zur Aktivierung der Proteinkinase C führt, am Internalisierungsprozess von CXCR3 beteiligt.

### *Chemotaxis*

Die Signalvermittlung, die zum komplexen Prozess der Chemotaxis führt, ist für die meisten Chemokinrezeptoren nur unzureichend geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, übereinstimmend mit Befunden aus der Literatur, dass PTX zu einer vollständigen Blockierung der I-TAC-induzierten Chemotaxis von Th1-Zellen führt und CXCR3, wie ein Großteil der Chemokinrezeptoren, seine Hauptsignale für die Migration über  $G\alpha_i$  vermittelt (Sauty et al., 2001). Es ist allgemein akzeptiert, dass alle Chemokinrezeptoren ihre Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren des Typs  $G\alpha_i$  vermitteln, obwohl einige Chemokinrezeptoren zudem über  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$ ,  $G\alpha_{14}$  und  $G\alpha_{16}$ -Proteine wirken (Soede et al., 2001; Gao et al., 2003). Zudem wurde gezeigt, dass CXCR3 präferentiell an  $G\alpha_i$  vor  $G\alpha_{16}$  koppelt (Tensen et al., 1999).

Die Effekte von AG490 auf die Th1-Migration hingegen führten überraschenderweise zu einer signifikant gesteigerten Chemotaxis. Dies steht im Kontrast zu gängigen Untersuchungen, in denen AG490 eine Blockade der Migration durch verminderte Adhäsionsfähigkeit bewirkt (Constantin et al., 1999). Die Gründe für diesen Effekt von AG490 konnten bisher nicht erklärt werden.

Die Signalvermittlung, die an der Zellmigration über den CXCR3-Rezeptor beteiligt ist, wird in der Literatur teils kontrovers diskutiert. Für CXCL9 wurde die Stimulierung des p44/p42 MAPK-Signalweges in Melanomzellen beschrieben (Robledo, 2001) und für beide CXCL9 und CXCL10 wurde eine Aktivierung des Ras/ERK, Src und des PI3K/Akt-Signalweges in gewebespezifischen Perizyten nachgewiesen (Bonacchi, 2001). Dennoch bleiben die CXCR3-Signale in T-Zellen als auch die Effekte von CXCL9, 10 und 11 auf die Aktivierung des p44/p42 MAPK- und Akt-Signalweges von Zellen, die heterolog CXCR3 exprimieren, weitestgehend unbekannt.

Für den PI3K/Akt- als auch p44/p42 MAPK-Signalweg wurde eine Beteiligung an der Chemokin-induzierten Migration von verschiedenen Zelltypen beschrieben (Qin et al., 1998; Loetscher et al., 1996; Boehme et al., 1999). In einer anderen Studie waren potente Inhibitoren von MEK1/2 nicht in der Lage, die CXCR3-vermittelte Transmigration und CXCR3-induzierte Aktin-Polymerisation von T-Zellen zu blockieren (Smit, 2003). Und obwohl Wortmannin und LY294002 (PI3K-Inhibitoren) sehr häufig verwendet wurden, um die Rolle

von PI3-Kinasen bei verschiedenen Zellantworten zu untersuchen, wurden gegensätzliche Ergebnisse erzielt. In manchen Studien führte der Einsatz von PI3K-Inhibitoren zur Blockierung der Chemotaxis (Coffer et al., 1998), in anderen nicht (Thelen et al., 1995; Neptune et al., 1997).

Als ein weiteres Signalmolekül, welches im Prozess der T-Zellmigration eine Rolle zu spielen scheint, wurde die Phospholipase C (PLC- $\beta$ ) beschrieben. Es bleibt jedoch zu untersuchen, welche der PLC nachfolgenden Moleküle zur Kontrolle des chemotaktischen Prozesses beitragen (Li et al., 2001).

#### **4.5 Einsatz von I-TAC(1-3)del in der Intravitalmikroskopie**

Das Ergebnis der Intravitalmikroskopie zeigte auf beeindruckende Weise, wie das Rollverhalten der eingesetzten Th1-Zellen durch Einsatz von Chemokin und Antagonist beeinflusst werden konnte. Die Stimulierung der Th1-Zellen durch das IP-10/CXCL10-Depot im Mausohr führte zu einem deutlich gesteigerten Rollen (200%) von CXCR3<sup>+</sup>-positiven Th1-Zellen an den Endothelzellen der Gefäßwand. Im Anschluss konnte dieses gesteigerte Rollverhalten durch Einsatz des CXCR3-Antagonisten I-TAC(1-3)del wieder auf den Normalwert inhibiert werden.

Es zeigte sich, dass sich diese Methode grundsätzlich sehr gut eignete, um die Leukozyten-Wanderung infolge verschiedener Stimuli und Antagonisten zu untersuchen. Die Ergebnisse dieses Experimentes ließen sich in nachfolgenden Versuchen nicht reproduzieren, da die Versuchstiere während des Versuchs oder nach Antagonistengabe verstarben. Ein Grund dafür konnte die, zu diesem Zeitpunkt unzureichende, Aufreinigung von I-TAC(1-3)del durch Lyophilisierung und Filtration gewesen sein (siehe Aufreinigung der Muteine). Die sehr dominante Inhibition, die durch den Antagonisten auch *in vitro* beobachtet wurde, ließ nachträglich den Schluss zu, dass sich in diesem suboptimal aufgereinigten I-TAC(1-3)del-Überstand noch Substanzen befanden, die, intraarteriell verabreicht, zum Sterben der Mäuse führen konnten.

Man muss zudem bedenken, dass die Prozedur an sich eine Belastung für den Organismus der Maus darstellt. Neben der systemischen Anästhesie, die bereits Stress für das Versuchstier darstellt, kommt noch der operative Eingriff an der Arterie hinzu. Weiterhin belastend für den Kreislauf der Maus ist das Applizieren von exogenem Flüssigkeitsvolumen in einem Bereich bis zu einem Milliliter pro Versuchstier, wenn man bedenkt, dass eine Maus im Durchschnitt etwa 2ml Blutvolumen hat.

Ein zusätzlicher Parameter, der den Erfolg des Experimentes beeinflusst, stellt die Applikationsart der Substanz dar. Substanzen oder Konzentrationen, die subkutan oder intravenös ohne Probleme verabreicht werden können, können intraarteriell durchaus

Komplikationen verursachen. Nach Injektion in eine Arterie gelangt der Wirkstoff in hoher Konzentration in immer kleinere Blutgefäße (da sich das Gefäßsystem verzweigt); es kann dann ggf. zu Schäden am Gewebe kommen. Bei einer intravenösen Injektion dagegen wird der Wirkstoff, während er weiter fließt, verdünnt. (pers. Kommun. mit Dr. vet. J. Pfeffer, Zentrum für Dermatologie und Venerologie, Frankfurt).

Um ein Sterben der Versuchstiere in Zukunft zu verhindern, muss, neben den oben genannten Parametern, mit absolut sauberen Substanzen gearbeitet werden und die Dosis für die intraarterielle Gabe optimiert werden.

### *Ausblick*

Wie bereits mehrfach erwähnt, besteht eine dringende Notwendigkeit zur Entwicklung therapeutischer Strategien für die Behandlung von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen. Der Einsatz von Chemokinrezeptor-Antagonisten ist nach wie vor ein viel versprechender Ansatz zur selektiven Inhibition der Infiltration von Leukozyten in entzündetes Gewebe.

Mit der Generierung von drei funktionell bioaktiven Chemokinrezeptor-Antagonisten kann die Hefe *Pichia pastoris* als erfolgreiches Expressionssystem von rekombinanten Proteinen angesehen werden.

Die Herstellung und Untersuchung von Chemokinrezeptor-Antagonisten trägt essentiell zum Verständnis von spezifischen Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktionen, sowie zu deren weiterführenden Signalvermittlung bei. Ohne diese Kenntnisse können sie nicht als therapeutische Option in Betracht gezogen werden. Eine Voraussetzung, die sich für die Untersuchungen aus dieser Arbeit ergibt, ist die optimale Reinheit der Antagonisten. Eine Optimierung der Aufreinigung der Muteine und eine Verbesserung der Ausbeute könnte möglicherweise durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren, aber auch durch eine Kombination aus Affinitäts- und Ionenaustausch-Chromatographie erzielt werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt zum Verständnis von Chemokinen und ihren Rezeptoren ist die Übertragung der unter *in vitro*-Bedingungen erhaltenen Daten in die *in vivo*-Situation. Hierfür ist die Methode der Intravitalmikroskopie ein wertvolles Werkzeug, um die Effekte und die Relevanz der Chemokinrezeptor-Antagonisten in einem *in vivo*-Modell zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der nephritogene T-Helfer-1-Zellklon, IF12, hinsichtlich seines Chemokinrezeptorprofils auf RNA- und Proteinebene charakterisiert, um ein definiertes Zellmodell zu besitzen, welches für die anschließende Austestung von drei Chemokinrezeptor-Antagonisten geeignet ist. Dazu wurde die RNA von Mitogen-aktivierten und unstimulierten Th1-Zellen gewonnen und das Chemokinrezeptorprofil mittels RT-PCR und cDNA-Array untersucht. Das Ergebnis dieser Experimente zeigte eine konstitutive Expression der Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5-7, CXCR3, CXCR4 auf RNA-Ebene. Durch die Aktivierung der Th1 Zellen mit ConA wurde eine signifikant gesteigerte Expression von den Rezeptoren CCR4, CCR6 und CCR7 und eine deutliche Reduktion der Expression von CCR5 und CXCR3 induziert. Auf Proteinebene konnte die Oberflächenexpression der für die Antagonistenstudien wichtigen Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5 und CXCR3 nachgewiesen werden. Hinsichtlich der gängigen Definition von T-Zell-Subtypen konnte der Th1IF12-Zellklon als *central memory* oder Gedächtnis-Zelltyp eingestuft werden (Sallusto et al., 1998). Dieser Zellklon wurde für die weiteren experimentellen Versuche verwendet.

Weiterhin wurden drei Chemokinrezeptor-Antagonisten, eine N-terminal deletierte Form des Chemokins MCP-1/CCL2, MCP-1(1-8)del, virales MIP-II und eine N-terminal deletierte Variante des Chemokins I-TAC/CXCL11, I-TAC(1-3)del, in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* exprimiert, durch Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigt und deren inhibitorische Wirkung auf die Th1-Zellen untersucht.

Durch die Expression in *Pichia pastoris* konnten drei funktionell bioaktive Chemokinrezeptor-Antagonisten generiert werden, die in der Lage waren, die spezifische Liganden-induzierte Th1-Chemotaxis Rezeptor-spezifisch zu inhibieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Kombination von zwei Chemokinen (MCP-1/CCL2 und IP-10/CXCL10 oder I-TAC/CXCL11) die Th1-Migration signifikant steigerte und, dass eine deutliche Inhibition dieser gesteigerten Chemotaxis durch simultanen Einsatz von MCP-1(1-8)del und I-TAC(1-3)del erzielt wurde.

Bei der Untersuchung zur Signalweiterleitung von CXCR3 wurde beobachtet, dass weder Pertussis-Toxin (PTX) noch AG490 einen Einfluss auf die I-TAC-induzierte Internalisierung hatte. Die I-TAC-vermittelte Chemotaxis konnte, wie erwartet durch PTX blockiert werden, wodurch die Signalvermittlung über  $G\alpha_i$  bestätigt wurde. AG490 führte überraschenderweise zu einer Steigerung der I-TAC-induzierten Chemotaxis. Die Effekte von PTX und AG490 wurden anschließend auf die I-TAC-induzierte Kalzium-Mobilisierung getestet und ergaben eine Blockierung des Kalziumsignals nach PTX-Behandlung, sowie ein verlängertes Kalziumsignal nach AG490-Behandlung.

Beim Einsatz des Chemokinrezeptor-Antagonisten I-TAC(1-3)del im *in vivo*-Modell zur Untersuchung der Leukozytenwanderung im Mausohr (Intravitalmikroskopie, IVM) konnte beobachtet werden, dass ein durch IP-10/CXCL10-Stimulierung gesteigertes Rollverhalten der Th1-Zellen am Venenendothel durch anschließende Antagonisten-Behandlung signifikant inhibiert wurde.

Zusammenfassend zeigt dies, dass die Expression der drei rekombinanten Chemokinrezeptor-Antagonisten, MCP-1(1-8)del, vMIP-II und I-TAC(1-3)del, in *Pichia pastoris* zu potenten und funktionell bioaktiven Proteinen führte, die ein viel versprechendes Werkzeug für die Behandlung Th1-vermittelter Entzündungskrankheiten darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbas** A.K., Murphy, K.M., and Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787–793
- Anders** H.J., Frink M., Linde Y., Banas B., Wornle M., Cohen C.D., Vielhauer V., Nelson P.J., Grone H.J., Schlöndorff D. 2003. CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J. Immunol.* 170(11):5658-5666
- Appay** V. and Rowland-Jones S. 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *TRENDS in Immunology.* 22(2):83-87
- Aragay** A., Frade J.M.R, Mellado M., Serrano A., Martinez-A C., Mayor Jr. F. 1998. MCP-1-induced CCR2b receptor desensitization by the G protein-coupled receptor kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2985-90
- Arai** H., Charo I.F. 1996. Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 271:21814-19
- Austrup** F., Vestweber D., Borges E., Lohning M., Brauer R., Herz U., Renz H., Hallmann R., Scheffold A., Radbruch A., Hamann A. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature*. 385:81–83
- Baggiolini** M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 250(2):91-104
- Baggiolini** M., Dewald B., Moser B. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55:97–179
- Baggiolini**, M., Dewald B., and Moser B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675
- Balashov** K.E., Rottman J.B., Weiner H.L., Hancock W.W. 1999. CCR5(+) ,and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:807-815
- Bandeira-Melo** C., Sugiyama K. Woods L.J., Weller P.F. 2001. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J. Immunol.* 276(25):22779-22787
- Boehme** S.A., Sullivan S.K., Crowe P.D., Santos M, Colon P.J., Sriramarao P., Bacon K.B. 1999. Activation of mitogen-activated protein kinase regulates eotaxin-induced eosinophil migration. *J Immunol.* 163(3):1611-1618
- Bonacchi** A., Romagnani P., Romanelli R.G., Efsen E., Annunziato F., Lasagni L., Francalanci M., Serio M., Laffi G., Pinzani M., Gentilini P., Marra F. 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(13):9945-9954
- Bonecchi** R., Bianchi G., Bordignon P.P., D'Ambrosio D., Lang R., Borsatti A., Sozzani S., Allavena P., Gray P.A., Mantovani A., Sinigaglia F. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187:129–134

- Booth V.**, Keizer D.W., Kamphuis M.B., Clark-Lewis I., Sykes B.D. 2002. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: Structure and receptor interactions. *Biochemistry* 41:10418-10425
- Boshoff C.**, Endo Y., Collins P.D., Takeuchi Y., Reeves J.D., Schweickart V.L., Siani M.A., Sasaki T., Williams T.J., Gray P.W., Moore P.S., Chang Y., Weiss R.A. 1997. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science* 278: 290-294
- Braun J.**, Sieper J. 2003. Overview of the use of the anti-TNF agent infliximab in chronic inflammatory diseases. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 3(1):141-168
- Bromley S.K.**, Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. 2001. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19:375-396
- Broxmeyer H.E.**, 2001. Regulation of hematopoiesis by chemokine family members. *Int. J. Hematol.* 4(1):9-17
- Burmester G.-R.**, Pezzutto A. 1998. Taschenatlas der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Chakravarty L.**, Rogers, L., Quach, T., Breckenridge, S. & Kolattukudy, P. E. 1998. Lysine 58 and histidine 66 at the C-terminal alpha-helix of monocyte chemoattractant protein-1 are essential for glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* 273, 29641–29647
- Chen S.**, Bacon K.B., Li L., Garcia G.E., Xia Y., Lo D., Thompson D.A., Siani M.A. Yamamoto T., Harrison J.K., Feng L. 1998. In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J. Exp. Med.* 188(1):193-198
- Chung C.Y.**, Funamoto S, and Firtel R. 2001. Signaling pathways controlling polarity and chemotaxis. *TRENDS in Biochem Sci.* 26(9):557-566
- Clark-Lewis I.**, Mattioli I., Gong J-H., Loetscher P. 2003. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J. Biol. Chem.* 278 (1):289-295
- Cocchi F.**, DeVico A.L., Garzino-Demo A., Arya S.K., Gallo R.C., Lusso P. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8<sup>+</sup> T cells. *Science* 270(5243), 1811-1815
- Cochran B.H.**, Reffel A.C., Stiles C.D. 1983. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 33:939-947
- Cockwell P.**, Calderwood J.W., Brooks C.J., Chakravorty S.J., and Savage C.O.S. Chemoattraction of T cells expressing CCR5, CXCR3 and CX3CR1 by proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 17:734-744
- Cockwell P.**, Howie A.J., Adu D., and Savage C.O. 1998. In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 54:827
- Coffer P.J.**, Schweizer R.C., Dubois G.R., Maikoe T., Lammers J.W., Koenderman L. 1998. Analysis of signal transduction pathways in human eosinophils activated by chemoattractants and the T-helper 2-derived cytokines interleukin-4 and interleukin-5. *Blood.* 91:2547-2557

- Cole K.E.**, Strick C.A., Paradis T.J., Ogborne K.T., Loetscher M., Gladue R.P., Lin W., Boyd J.G., Moser B., Wood D.E., Sahagan B.G., Neote K. 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(12):2009-2021
- Connor S.J.**, Paraskevopoulos N., Newman R., Cucan N., Hampartzoumian T., Lloyd AR., Grimm MC. 2004. CCR2 expressing CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are preferentially recruited to the ileum in Crohn's disease. *Gut* 53:1287-1294
- Constantin G.**, Landama C., Brocke S., Butcher E.C. 1999. Inhibition of experimental Autoimmune Encephalomyelitis by tyrosine kinase inhibitor. *J. Immunol.* 162:1144-1149
- Cornelissen G.**, Bertelsen H.-P., Hahn B., Schultz M., Scheffler U., Werner E., Leptien H., Krüß S., Jansen A.-K., Gliem T., Hielscher M., Wilhelm B.-U., Sowa E., Radeke H.H., Luttmann R. 2003. Herstellung rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris* in integrierter Prozessführung. *Chemie Ingenieur Technik.* 75(3):281-290
- Croft M.**, Dubey C. 1997. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit. Rev. Immunol.* 17(1): 89-118
- Crump M.P.**, Gong J.H., Loetscher P., Rajarathnam K. Amara A., Arenzana-Seisdeos F., Virelizier J.L., Baggiolini M., Sykes B.D, Clark-Lewis I. 1997. Soluton structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 16(23):6996-7007
- Czaplewski L.G.**, McKeating J., Craven C.J., Higgins L.D., Appay V., Brown A., Dudgeon T., Howard L.A., Meyers T., Owen J. et al. 1999. *J. Biol. Chem.* 274:16077-16084
- Dairaghi D.J.**, Fan R.A., McMaster B.E., Hanley M.R. Schall T.J. 1999. HHV8-encoded vMIP-I selectively engages chemokine receptor CCR8. Agonist and antagonist profiles of viral chemokines. *J. Biol. Chem.* 274(31):3233-3240
- Damaj B.B.**, McColl S.R., Neote K., Somgqing N., Ogborn K.T., Herbert C.A., Naccache P.H. 1996. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *FASEB J.* 10(12):1426-1434
- Dieu-Nosjean M.-C.**, Vicari A., Lebecque S., and Caux C. 1999. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 252-262
- Eckart M.R.**, Bussineau C.M. 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:525-530
- Elsner J.**, Petering H., Höchstetter R., Kimmig D., Wells TN., Kapp A., Proudfoot AE. 1997. The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. *Eur. J. Immunol.* 27:11, 2892-98
- Farber J.M.** 1997. MIG and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukocyte Biol.* 61: 246-257
- Fernandez E.J.**, Wilken J., Thompson D.A., Peiper S.C., Lolis E. 2000. Comparison of the structure of vMIP-II with eotaxin-1, RANTES, and MCP-3 suggests a unique mechanism for CCR3 activation. *Biochemistry* 39:12837-12844
- Flier J.**, Boorsma D.M., van Beek P.J., Nieboer C., Stoof T.J., Willemze R., Tensen C.P. 2001. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of kin inflammation. *J. Pathol.* 194(4):398-405

**Frink M.**, 2003. Zur Funktion des CC-Chemokins RANTES/CCL5 bei der Immunkomplex-  
Glomerulonephritis. Dissertation L.-M. Universität München

**Gao Z.**, and Metz W.A. 2003. Unraveling the Chemistry of Chemokine Receptor Ligands.  
*Chem. Reviews* 13:3733-3752

**Ghirnikar R.S.**, Lee Y.L., Eng L.F. 2000. Chemokine antagonist infusion attenuates cellular  
infiltration following spinal cord contusion injury in rat. *J. Neurosci. Res.* 59:63-73

**Glabinski A.R.**, Balasingam V., Tani M., Kunkel S.L., Strieter R.M., Yong V.W., Ransohoff  
R.M. 1996. Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after  
mechanical injury to the brain. *J. Immunol.* 156:4363-4368

**Gong J.H.**, Clark-Lewis I. 1995. Antagonist of monocyte chemoattractant protein-1 identified  
by modification of functional critical NH<sub>2</sub>-terminal residues. *J. Exp. Med.* 181, 631-640

**Gong J.H.**, Ratkay L.G., Waterfield J.D., Clark-Lewis I. 1997. An antagonist of monocyte  
chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J. Exp.  
Med.* 186:1, 131-137

**Griffiths C.E.**, Railan D., Gallatin W.M., Cooper K.D.: The ICAM-3/LFA-1 interaction is critical  
for epidermal Langerhans cell alloantigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells. *Br J Dermatol*  
133:823-829, 1995

**Hancock WW.**, Lu B., Gao W., Csizmadia V., Faia K., King JA., Smiley ST., Ling M., Gerard  
NP., Gerard C. 2000. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft  
rejection. *J. Exp. Med.* 192:1515-1520

**Handel T.M.**, Domaille P.J. 1996. Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and  
solution structure of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry*  
35:6569-6584

**Hasegawa H.**, Fujita S. 2001. Chemokines and lymphocytes: role of chemokines and their  
receptors in the immune system. *Cell Mol Biol* 47(4):599-607

**Hesselgesser J.**, Ng H.P., Liang M., Zheng W., May K., Bauman J.G., Monahan S., Islam I.,  
Wei G.P., Ghannam A., Taub D.D., Rosser M., Snider R.M., Morrissey M.M., Perez H.D.,  
Horuk R. 1998. Identification and characterization of small molecule functional antagonists of  
the CCR1 chemokine receptor. *J Biol Chem.* 273(25):15687-15692

**Holzknicht Z.E.**, and Platt J.L. 2000. The fine cytokine line between graft acceptance and  
rejection. *Nat. Med.* 6:497-498

**Hoogewerf A.J.**, Kuschert G.S.V., Proudfoot A.E.I., Borlat F., Clark-Lewis I., Power C.A.,  
Wells T.N.C. 1997. Glycosaminoglycans mediate cell surface ligomerization of chemokines.  
*Biochemistry* 36:13570-13578

**Hora K.**, Satriano J.A., Santiago A., Mori T., Stanley E.R., Shan Z., Schlöndorff D. 1992.  
Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and  
colony-stimulating factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(5):1745-1749

**Horuk R.**, 2001. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12(4):313-335

**Horuk R.**, Shurey S, NG HP, May K, Bauman JG, Islam I, Ghannam A, Buckman B, Wei GP, Xu W, Liang M, Rosser M, Dunning L, Hesselgesser J, Snider RM, Morrissey MM, Perez HD, Green C: CCR1-specific non-peptide antagonist: efficacy in a rabbit allograft rejection model. *Immunol Lett.* 2001. 76(3):193-201

**Hoth M.**, Button D.C., Lewis R.S. 2000. Mitochondrial control of calcium channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(19):10607-10612

**Iglesias P.A.**, Levchenko A. 2002. Modeling the cell's guidance system. *Sci STKE* (148):RE12

**Inan M.**, Meagher M.M. 2000. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioengng* 92:585-589

**Ji T.H.**, Grossmann M., Ji I. 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273(28):17299-17302

**Jiang H.**, Kuang Y, Wu Y, Surcka A, Simon MI, Wu D. 1996. Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors. *J. Biol. Chem.* 27:13430-34

**Kapsenberg M.L.** 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3:984-992

**Kautz K.**, Schwarz M., Radeke H.H. 2005. Interference with MCP-1 gene expression by vector generated triple helix-forming RNA oligonucleotides. *Cell Mol. Life Sci.* 62:362-276

**Kim C.H.**, Rott L., Kunkel E.J., Genovese M.C., Andrew D.P., Wu L., Butcher E.C. 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J. Clin. Invest.* 108(9):1331-1339

**Kledal T.N.**, Rosenkilde M.M., Coulin F., Simmons G., Johnson A.H., Alouani S., Power C.A., Lüttichau H.R., Gerstoft J., Clapham P.R., Clark-Lewis I., Wells T.N, Schwartz T.W. 1997. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science* 277(5332):1656-1659

**Koopmann W.**, Ediriwickrema C., Krangel M.S. 1999. Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of the chemokine MIP-1 $\beta$ . *J. Immunol.* 163: 2120-2127

**Kuschert G.S.V.**, Coulin F., Power C.A., Proudfoot A.E.I., Hubbard R.E., Hoogewerf A.J., and Wells T.N.C. 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38:12959-12968

**Lasagni L.**, Francalanci M., Annunziato F., Lazzeri E., Giannini S., Cosmi L., Sagrinati C., Mazzinghi B., Orlando C., Maggi E., Marra F., Romagnani S., Serio M. and Romagnani P. 2003. An alternative 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(11): 1537-49

**Lau E.K.**, Paavola C.D., Johnson Z., Gaudry J-P., Geretti E., Borlat F., Kung A.J., Proudfoot A.E., Handel T.M. 2004. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J. Biol. Chem.* 279(21):101-124

- Laurence** J.S, Blanpain C., Burgner J.W., Parmentier M., and LiWang P.J. 2000. CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding. *Biochemistry* 39(12):3401-3409
- Li** Z., Jiang H., Xie W., Zhang Z., Smrcka A.V., Wu D. 2000. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287:1046-1049
- Liwang** A.C., Wang Z.X., Sun Y., Peiper S.C., Liwang P.J. 1999. The solution structure of the anti-HIV chemokine vMIP-II. *Protein Sci.* 8(11): 2270-80
- Lloyd** C.M., Minto A.W., Dorf M.E., Proudfoot A.E., Wells T.N.C, Salant D.J., and Gutierrez-Ramos J.-C. 1997. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1371-1380
- Locati** M., Zhou D., Luini W., Evangelista V., Mantovani A., Sozzani S. 1994. Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. Role of calcium influx, synergism with platelet-activating factor and significance for chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 269:4746-53
- Loetscher** M., Gerber B., Loetscher P. et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. 1996. *J Exp Med.* 184:963-969
- Luster** A.D. 1998. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338(7):436-445
- Luster** A.D., Greenberg S.M., Leder P. 1995. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelets factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J. Exp. Med.* 182:219
- Mack** M., Bruhl H., Gruber R., Jaeger C., Cihak J., Eiter V., Plachy J., Stangassinger M., Uhlig K., Schattenkirchner M., and Schlöndorff D. 1999. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum* 42(5):981-988
- Marchand** P., Resch K., Radeke. H.H. 2000. Selective inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human embryonal kidney cells by specific triple helix-forming oligonucleotides. *J. Immunol.* 164(4):2070-2076
- Matsui** T., Akahoshi T., Namai R., Hashimoto A., Kurihara Y., Rana M., Nishimura A., Endo H., Kitasato H., Kawai S., Takagishi K., Kondo H. 2001. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 125(1):155-161
- Matsushima** K., Morishita K., Yoshimura T., Kobayashi Y., Lew W., Appella E., Kung H.F., Leonard E.J., Oppenheim J.J. 1988. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 167(6):1883-1893
- Mellado** M., Rodriguez-Frade J.M., Aragay A., del Real G., Martin A.M., Vial-Coro A.J., Serrano A., Mayor F. Jr., Martinez-A C. 1998. The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J. Immunol* 161(2):805-813

- Mellado M.**, Rodriguez-Frade J., Manes S., and Martinez-A. C. 2001. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu. Rev. Immunol.* 19:397-421
- Meyer M.**, Erdel M., Duba H.C., Werner E.R., Werner-Felmayer G. 2000. Cloning, genomic sequence, and chromosome mapping of Scyb11, the murine homologue of SCYB11 (alias  $\beta$ R1/H174/SCYB9B/I-TAC/CXCL11). *Cytogenet. Cell Genet.* 88: 278-282
- Meyer M.**, Hensbergen P.J., van der Raaij-Helmer E.M.H., Brandacher G., Margreiter R., Heufler C., Koch F., Narumi S., Werner E.R., Colvin R., Luster A.D., Tensen C.P. and Werner-Felmayer G. 2001. Cross reactivity of three T cell attracting murine chemokines stimulating the CXC chemokine receptor CXCR3 and their induction in cultured cells and during allograft rejection. *Eur. J. Immunol.* 31:2521-2527
- Middleton J.**, Patterson A.M, Gardner L., Schmutz C., Ashton B.A. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100:3853-3860
- Müller A.**, Strange P.G. 2003. CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins. *FEBS Lett.* 570(1-3):126-132
- Muller W.A.** 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammation response. *Lab. Invest.* 82(5):521-533
- Murakami T.**, Yamamoto N. 2000. Roles of chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int. J. Hematol.* 72(4):412-417
- Murphy P.M.** 1994. The molecular biology of of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu.Rev. Immunol.* 12:593-633
- Myers S.J.**, Wong LM, Charo IF. 1995. Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270:5786-92
- Neptune E.R.**, Bourne H.R: 1997. Receptors induce chemotaxis by releasing the  $\beta\gamma$  subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 94(26):14489-14494
- New D.C.**, Wong Y.H. 2003. CC Chemokine Receptor-coupled Signalling Pathways. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 35(9):779-788
- Ono S.J.**, Nakamura T., Miyazaki D., Ohbayashi M., Dawson M., and Toda M. 2003. Chemokines: Role in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J.Allergy Clin Immunol.* 111(6):1185-1199
- Onuffer J.J.**, Horuk R. 2002. Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *TRENDS in Pharm. Sci.* 23(10):459-467
- Owen C.** 2001. Chemokine receptors in airway disease: which receptors to target? *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14(3):193-202
- Paleolog E.** 2003. The therapeutic potential of TNF-alpha blockade in rheumatoid arthritis. *Expert. Opin. Invest. Drugs.* 12(7):1087-1095

- Panzer U.**, Schneider A., Wilken J., Thompson DA., Kent SB., Stahl RA. 1999. The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56:6, 2107-15
- Panzer U.**, Schneider A., Steinmetz O.M., Wenzel U. Barth P., Reinking R., Becker J.U., Harendza S., Zahner G., Fischereeder M., Kramer B.H., Schlöndorff D., Ostendorf T., Floege J., Helmchen U., Stahl R.A. 2005. The chemokine receptor 5 Delta32 mutation is associated with increasing renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* 67(1):75-81
- Patel D.D.**, Zachariah JP., and Winchard LP. 2001. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin. Immunol.* 98:39-45
- Patterson A. M.**, C. Schmutz, S. Davis, L. Gardner, B. A. Ashton, and J. Middleton. 2002. Differential binding of chemokines to macrophages and neutrophils in the human inflamed synovium. *Arthritis Res* 4:209
- Petkovic V.**, Moghini C., Paoletti S., Uguccioni M., Gerber B. 2004. I-TAC(CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. *J. Leukoc. Biol.* 76(3): 701-708
- Prinz B.**, Schultchen J., Rydzewski R., Holz C. Boettner M., Stahl U., Lang C. 2004. Establishing a versatile fermentation and purification procedure for human proteins expressed in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* for structural genomics. *J. Struct. Funct. Genomics.* 5(1-2):29-44
- Prodjosudjadi W.**, Gerritsma J.S, Klar-Mohamad N., Gerritsen A.F., Bruijn J.A., Daha M.R., and van Es L.A. 1995. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 48:1477
- Proudfoot A.E.**, Power C.A., Hoogewerf A.J., Montjovent M.O., Borlat F., Offord R.E., Wells T.N. 1996. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J. Biol. Chem.* 271(5)2599-2603
- Proudfoot A.E.I.**, Fritchley S., Borlat F., Shaw J.P., Vilbois F., Zwahlen C., Trkola A., Marchant D., Clapham P.R., and Wells T.N.C. 2001. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J. Biol. Chem* 276:10620-10626
- Qin S.**, Rottman JB, Myers P., Kassam N., Weinblatt M., Loetscher M., Koch A.E., Moser B., Mackay C.R. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest.* 101:746-754.
- Rabin R.L.**, Park M.K., Liao F., Swofford R., Stephany D., Farber J.M. 1999. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J. Immunol.* 162(7):3840-3850
- Radeke H.H.**, Janssen-Graafls I., Sowa E.N., Löscher F., Schmidt R.E., Gessner J.E. 2002. Opposite regulation of type II and III receptors for immunoglobulin G in mouse glomerular mesangial cells and in the induction of anti-glomerular basement membrane (GBM) nephritis. *J. Biol. Chem.* 277(30):27535-27544
- Radeke H.H.**, Tschernig T., Karulin A., Schumm G., Emancipator S.N., Resch K., Tary-Lehmann M. 2002. CD4+ T cells recognizing specific antigen deposited in glomeruli cause glomerulonephritis-like kidney injury. *Clin. Immunol.* 104(2):161-173

- Rodriguez-Frade** J.M., Vila-Coro A.J., Martin de Ana A., Albar J.P., Martinez-A C., Mellado M. 1999. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 96(7):3628-3633
- Rodriguez-Frade** J.M., Vila-Coro A.J., Martin de Ana A., Nieto M., Sanchez-Madrid F., Proudfoot A.E.I., Wells T.N.C., Martinez-A C., Mellado M. 1999. Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J. Cell. Biol.* 144:755-765
- Rollins** B.J., Stier P., Ernst T., Wong G.G. 1989. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell. Biol.* 9(11):4687-4695
- Romanos** M.A., Scorer C.A., Clare J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8:423-488
- Rot** A. 1993. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J. Immunol.* 23: 303-306
- Rottmann** J.B., Smith T.L., Ganley K.G., Kikuchi T., Krueger J.G. 2001. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Lab. Invest.* 81(3):335-347
- Sanger** F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-determinating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Sallusto** F., Geginat J., Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annu . Rev. Immunol.* 22:745-763
- Sallusto** F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708-712
- Sallusto** F., Lenig, D., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187:875-883
- Samstag** Y., Eibert S.M., Klemke M., Wabnitz G.H. 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J.Leuk. Biol.* 73(1):30-48
- Sanchez-Madrid**, F., and del Pozo M.A.. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 18:501
- Sauty** A., Dziejman M., Taha R.A., Iarossi A.S., Neote K., Garcia-Zepeda E.A., Hamid Q., Luster A.D. 1999. The T cell-specific CXC chemokines IP-10, MIG, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* 162(6):3549-3558
- Sauty** A. Colvin R.A., Wagner L., Rochat S., Spertini F., and Luster A.D. 2001. CXCR3 Internalization Following T Cell-Endothelial Cell Contact: Preferential Role of IFN-Inducible T Cell Chemoattractant (CXCL11). *J. Immunol.* 167:7084-7093
- Schall** T.J. 1991. Biology of RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 3(3):165-183
- Segerer** S., Banas B, Wornle M, Schmid H, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Kiss E, Nelson PJ, Schlondorff D, Grone HJ. 2004. CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 2004 Feb;164(2):635-49

- Segerer S.**, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, Schlondorff D, Alpers CE. 2000. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000 Dec;11(12):2231-42
- Sgro C.** 1995. Side-effects of a monoclonal antibody, muromab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* 105(1):23-29
- Sheppard H.W.**, Celum C., Michael N.L., O'Brien S., Carrington M., Dondero D., Buchbinder S.P. 2002. HIV-1 infection in individuals with CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-induced virus at seroconversion. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 29(3):307-313
- Shriver Z.**, Liu D., Sasisekhara R. 2002. Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions. *Trends Cardiovasc. Med.* 12(2): 71-77
- Simpson J.** Rezaie P., Newcombe J., Cuzner M.L., Male D., Woodroffe M.N. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J. Neuroimmunol* 108(1-2):192-200
- Smit M.**, Verdijk P., van der Raaij-Helmer E.M., Navis M., Hensbergen P.J., Leurs R., Tensen C.P. 2003. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood.* 102(6): 1959-1965
- Soede R.D.**, Zeelenberg I.S., Wijnands Y.M., Kamp M., Roos E. 2001. Stromal cell-derived factor-1-induced LFA-1 activation during in vivo migration of T cell hybridoma cells requires Gq/11, RhoA, and myosin, as well as Gi and Cdc42. *J Immunol.* 166:4293-4301
- Sozzani S.**, Sallusto F., Luini W, et al. 1995. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J.Immunol.* 155:3292-3295
- Sreerashtra K.**, Brankamp R.G., Kropp K.E., Blankenship D.T., Tsay J.T., Smith P.L. 1997. Strategies of optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190:55-62
- Stahl R.A.**, Thaiss F., Disser M., Melmchen U., Hora K., Schlöndorff D. 1993. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti.thymocyte antibody-injured glomerulonephritis. *Kidney Int.* 44(5):1036-1047
- Stein J.V.**, M'rini C., Nombela-Arrieta C., de Buitrage G.G., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Girard J.P., Martinez-A. C. 2003. CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood.* 101(1):38-44
- Stellato C.**, Brummet M.E., Plitt J.R., Shahabuddin S., Baroody F.M., Liu M.C., Ponath P.D., Beck L.A. 2001. Expression of the CC chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J. Immunol* 166(3):1457-1461
- Streit W.J.**, Conde J.R., Harrison J.K. 2001. Chemokines and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 22(6):909-913
- Takami S.**, Minami M., Nagata I., Namura S., Satho M. 2001. Chemokine receptor antagonist peptide, viral MIP-II, protects the brain against focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:1430-1435

- Tensen C.P.**, Flier J., Van Der Raaij-Helmer E.M., Sampat-Sardjoeipersad S., Van Der Schors R.C., Leurs R., Scheper R.J., Boorsma D.M., Willemze R. 1999. Human IP-9: a keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/MIG receptor (CXCR3). *J. Invest. Dermatol.* 112(5):716-722
- Thelen M.**, Uguccioni M., Bosiger J. 1995. PI 3-kinase- dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 217:1255-1262.
- Thomsen A.R.**, Nansen A, Madsen A.N, Bartholdy C., Christensen J.P. 2003. Regulation of T cell migration during viral infection: role of adhesion molecules and chemokines. *Immunology Letters*, 85 (2):119-127
- Van Coillie E.**, Van Damme J., Opdenakker G. 1999. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:61-86
- Van Der Voorn P.**, Tekstra J., Beelen R.H., Tensen C.P., Van der Valk P., De Groot C.J. 2001. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 154(1):45-51
- Varki A.** 1994. Selectin ligands. *Proc. Natl. AcadSci. USA.* 91(16):7390-7379
- Vila-Coro A.J.**, Rodriguez-Frade J.M., Martin de Ana A., Moreno-Ortiz M.C., Martinez-A C., Mellado M. 1999. The chemokine SDF-1 $\alpha$  triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* 13:1699-1710
- Wagner L.**, Yang O.O., Garcia-Zepeda E.A., Ge Y., Kalams S.A., Walker B.D., Pasternack M.S., and Luster A.D. 1998. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391:908-911
- Waldmann T.A.**, O'Shea J. 1998. The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 10(5):518-524
- Wang G.**, O K. 2001. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. *Biochem J.* 357(Pt1):233-240
- Ward S.G.** 2004. Do phosphoinositide 3-kinase direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol.* 25(2):67-74
- Wedderburn L.R.**, Robinson N., Patel A., Varsani H., and Woo P. 2000. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:765-774
- Widney D.P.**, Xia Y.-R., Lulis A.J., and Smith J.B. 2000. The murine chemokine CXCL11 (IFN-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant) is an IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharid-inducible glucocorticoid-attenuated response gene expressed in lung and other tissues during endotoxemia. *J.Immunol.* 164: 6322-6331
- Williams J.G.** 1999. Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends Biochem. Sci* 24:333-334
- Witt D.P.**, Lander A.D. 1994. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan suppopulations. *Curr. Biol.* 4:394

**Yamamoto**, J., et al. 2000. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 68:568–574

**Zhang** Y.J., Rutledge B.J. and Rollins B.J. 1994. Structure/activation analysis of human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by mutagenesis. Identification of a mutated protein that inhibits MCP-1 mediated monocyte chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 269 (22):15918-24

## 7. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Simone Rubant  
Anschrift: Grafenbergerstr. 20, 63110 Rodgau  
Geboren: 22.11.1975 in Offenbach /Main  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1981-186 Münchhausen-Schule in Hainhausen  
1987-1995 Franziskaner-Gymnasium Kreuzburg in Groß-Krotzenburg  
1995 Abitur (Note 2,7)

### Universitäre Ausbildung:

10/1995-04/1996 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg  
04/1996-06/2000 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt  
Schwerpunkte: Biochemie  
Mikrobiologie  
Zell-und Entwicklungsbiologie  
06/200-02/2001 Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut, Langen und Robert-Koch-Institut, Berlin  
02/2001 Diplom und Diplomarbeit (Note: sehr gut)  
06/2001-2004 Promotion zum Dr. rer. nat. im *pharmazentrum frankfurt*  
01/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im *pharmazentrum frankfurt* und im Zentrum für Dermatologie und Venerologie

## 8. Eigene Veröffentlichungen und Poster:

Specke V., **Rubant S.**, Denner J. 2001. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology*. 2001 Jul 5;285(2):177-80

**S. Rubant**, M. Schwarz, E Werner, R. Luttmann, H.H. Radeke. Eukaryotic expression of chemokine receptor antagonists and their activity on murine pro-inflammatory cells. (in Bearbeitung).

51. Mosbacher Kolloquium 2002. Expression, characterization and functional analysis of viral MIP-II. **S. Rubant**, M. Schwarz, R. Luttmann, H.H. Radeke.

34. Jahrestagung der DGfI (Deutsche Gesellschaft für Immunologie), Marburg, 2002. Functional analysis of different murine antagonists to inflammatory chemokine receptors. **S. Rubant**, Elisabeth Werner, M. Schwarz, H.H. Radeke.

35. Jahrestagung der DGfI, 2003, Berlin. Development of chemokine receptor antagonists for combined chemokine receptor blockade in inflammatory disease models. **Simone Rubant**, Elisabeth Werner, Mario Schwarz, Josef M. Pfeilschifter, Heinfried H. Radeke

44. Frühjahrstagung der DGPT (Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie), Mainz 2003. Wirkung verschiedener muriner Antagonisten auf inflammatorische Chemokinrezeptoren. **S. Rubant**, E. Werner, M. Schwarz, R. Luttmann, J.M. Pfeilschifter, H.H. Radeke

45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz 2004. Characterization of different murine antagonists to inflammatory Chemokine receptors. **S. Rubant**, E.Werner, M.Schwarz, R. Luttmann, J.M. Pfeilschifter, H.H. Radeke

## 9. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Josef Pfeilschifter für die Eingliederung in ein innovatives Forschungsinstitut, das *pharmazentrum frankfurt*, und die Begleitung meiner Promotion.

Mein herzlicher Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Heinfried Radeke für die Möglichkeit, an diesem überaus interessanten immunpharmakologischen Thema arbeiten zu dürfen, sowie für die direkte wissenschaftliche Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bei allen meinen liebenswerten Arbeitskollegen bedanken, für die hervorragende Atmosphäre und Unterstützung während unserer gemeinsamen Arbeit: Martina Herrero und Sandra Spiegler, für eine vertrauensvolle und angenehme Zusammenarbeit; Kirsten Stoidtner; Judith Calderwood, Judith Moskowitz; Marcel Adler, Kordula Kautz und Dietmar Falke.

Vielen Dank an Herrn Dr. Mario Schwarz für seine sehr kompetente und überaus motivierende Betreuung zu Beginn dieser Arbeit und für seine Freundschaft darüber hinaus.

Vielen Dank den anderen Mitstreitern des 4. Stocks für Ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft: Sylvia Gurrieri, Ulrike Haas, Bettina Thorwart; Dr. Luijdmila Turchanowa.

Danke an alle übrigen Kollegen des *pharmazentrums frankfurt*.

Mein grenzenloser Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Situation unterstützt und beraten haben und, ohne die mein sorgenfreies Studium und meine Promotion so nicht möglich gewesen wären.

Ein ebenso besonderer Dank gilt meinem Patenonkel, Herrn Dr. Helmut Korbanka, für viele interessante und tief greifende Diskussionen über Wissenschaft und Forschung und für seine immerwährende Motivation.

Ich danke Herrn Prof. Thomas Holstein und Herrn Prof. Gerhard Thiel für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

## 10. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass diese Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel, als die angegebenen, erstellt wurde.

Rodgau, den 23. Februar 2005