

**Charakterisierung der Funktion des *switch-associated protein 70* (SWAP-70) in der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Susann Piehler  
geboren am 07. September 1982 in Werdau**

**Gutachter**

1. Prof. Dr. med. Johannes Norgauer, Jena
2. PD Dr. rer. nat. habil. Jörg Müller, Jena
3. Prof. Dr.rer. nat. Rolf Jessberger, Dresden

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 02.06.2015

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Neutrophile Granulozyten als Teil des angeborenen Immunsystems	3
2.2 Chemotaxine lösen verschiedene zelluläre Reaktionen neutrophiler Granulozyten aus	4
2.2.1 Adhäsion und Chemotaxis	4
2.2.2 Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS-Produktion)	5
2.3 Das N-Formylpeptid fMLP-ein Chemotaxin neutrophiler Granulozyten	7
2.3.1 Die Funktion der MAP-Kinasen	8
2.3.2 Die Funktion der Rac-GTPasen	9
2.4 Das <i>switch-associated protein 70</i> (SWAP-70)	10
2.4.1 Struktur und Expression	10
2.4.2 SWAP-70 und die GEFs der Dbl-Proteinfamilie	11
2.4.3 Funktionen von SWAP-70 in murinen Immunzellen	12
2.4.3.1 SWAP-70 in murinen B-Zellen	12
2.4.3.2 SWAP-70 in murinen Mastzellen	13
2.4.3.3 SWAP-70 in murinen dendritischen Zellen	14
2.4.3.4 SWAP-70 in murinen eosinophilen Granulozyten	14
2.5 Zielstellung der Arbeit	15
<b>3 Material</b>	<b>16</b>
3.1 Versuchstiere	16
3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits	16
3.3 Geräte, sonstige Materialien, Software-Programme	17
3.4 Stimulantien und Hemmstoffe	19
3.5 Zellkulturmedien, Lösungen und Stammlösungen	20
3.6 Herstellung verschiedener Percoll-dichten	20
3.7 Antikörper	21
3.7.1 primäre Antikörper	21
3.7.2 sekundäre Antikörper und Isotypenkontrollen	22
3.8 Puffer und Zellkulturmedien	22

---

<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
4.1	Zellbiologische Methoden	24
4.1.1	Gewinnung und Anreicherung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark von Mäusen	24
4.1.2	Bestimmung der Reinheit und Vitalität der murinen neutrophilen Granulozyten	26
4.1.3	Durchflusszytometrie	26
4.1.4	<i>In vitro</i> -Migration	27
4.1.5	Messung des filamentösen Aktins (F-Aktin)	29
4.1.6	Adhäsionsassay	29
4.1.7	Analyse der fMLP-Rezeptoren sowie des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche	30
4.1.8	Bestimmung des reaktiven Sauerstoffmetaboliten $\bullet\text{O}_2^-$	31
4.2	Proteinanalytische Methoden	32
4.2.1	Aktivierung und Lyse muriner neutrophiler Granulozyten	32
4.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
4.2.3	Western Blot und Immunodetektion von Proteinen	33
4.2.4	<i>Stripping</i> von PVDF-Membranen	33
4.2.5	<i>Pulldown</i> -Experimente	34
4.3	Molekularbiologische Methoden	35
4.3.1	RNA-Isolierung und Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA	35
4.3.2	Reverse Transkription	36
4.3.3	Quantitative RT-PCR	36
4.4	Statistische Auswertung und Darstellung	38
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
5.1	Analyse der Reinheit der isolierten murinen neutrophilen Granulozyten	39
5.2	Murine neutrophile Granulozyten synthetisieren SWAP-70	41
5.3	SWAP-70 beeinflusst die Aktivierung der Rac2-GTPase	41
5.4	SWAP-70 beeinflusst die ROS-Produktion	43
5.5	SWAP-70 beeinflusst die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/p44, jedoch nicht die Aktivierung der Proteinkinasen AKT und GSK3 $\beta$	46

---

5.6	SWAP-70 ist nicht in die Migration und Aktinpolymerisierung eingebunden	49
5.7	SWAP-70 beeinflusst die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche, die CD11b-Proteinmenge und die CD11b-Genexpression	51
5.8	SWAP-70 beeinflusst die Adhäsion an Fibrinogen	53
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
6.1	Murine neutrophile Granulozyten synthetisieren SWAP-70	54
6.2	SWAP-70 begünstigt die Aktivierung der Rac2-GTPase	54
6.3	SWAP-70 beeinflusst die ROS-Produktion	56
6.4	SWAP-70 beeinflusst die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/p44, jedoch nicht die Aktivierung der Proteinkinasen AKT und GSK3 $\beta$	57
6.5	SWAP-70 beeinflusst nicht die Migration und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts	59
6.6	SWAP-70 beeinflusst die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche und die Adhäsion an Fibrinogen	60
6.7	Modell der funktionellen Bedeutung von SWAP-70	61
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>78</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
<i>aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	chemotaktische Index
CRIB-Domäne	Cdc42/Rac interaktive Bindungsdomäne
C-terminal	carboxyterminal
Ct-Wert	Schwellenwertzyklus
Dbl	<i>diffuse B cell lymphoma</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCK 2	<i>dedicator of cytokinesis 2</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N' tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie
F-Aktin	filamentöses Aktin
FcεRI	Rezeptor für Fc-Region von IgE
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FPR1 und FPR2/ALX	Formylpeptid Rezeptor 1 und 2
FSC	Vorwärtsstreulicht, <i>forward scatter</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
Gr-1	Granulozytenrezeptor 1
GSK3 $\beta$	Glykogensynthasekinase 3 $\beta$
GST-Tag	Glutathion-S-Transferase-Tag
GTP	Guanosintriphosphat
GTP $\gamma$ S	Guanosin-5'-O-[ $\gamma$ -thio]triphosphat
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAP-Kinasen	mitogenaktivierte Proteinkinasen
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
m/v	<i>weight per volume</i> (dt.: Masse pro Volumen)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadate
NBD	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)
NP-40	Nonidet P-40
ns	nicht signifikant
N-terminal	aminoterminal
p42/p44	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK1B	<i>p21 activated kinase 1B</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI3K $\gamma$	Phosphatidylinositol-3-Kinase $\gamma$
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

---

PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P-Rex1	<i>PIP<sub>3</sub>-dependent Rac exchanger 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen spezies</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Mittelwert des Standardfehlers
SLAT/IBP	<i>SWAP-70-like adapter of T cells/IRF-4-binding protein</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht, <i>side scatter</i>
SWAP-70	<i>switch-associated protein 70</i> (Protein)
Swap-70	<i>switch-associated protein 70</i> (Gen)
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
v/v	<i>volume per volume</i> (dt.: Volumen pro Volumen)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel



## **1 Zusammenfassung**

Nach der Entdeckung des *switch-associated protein 70* (SWAP-70) in B-Zellen wurde das Signalprotein in einer Vielzahl von Geweben aber auch murinen und humanen Immunzellen nachgewiesen und näher untersucht. Die Proteinstruktur von SWAP-70 zeigt unter anderem eine Pleckstrin-Homologie-Domäne, die sich N-terminal an die Dbl-Homologie-Domäne anschließt. Sie weicht damit von der Proteinstruktur der GEFs der Dbl-Proteinfamilie, bei denen die Pleckstrin-Homologie-Domäne C-terminal der Dbl-Homologie-Domäne liegt, ab. Aufgrund der abweichenden Proteinstruktur wird SWAP-70 einer eigenen Proteinfamilie zugeordnet. Bislang beinhaltet diese Proteinfamilie als einzigen weiteren Vertreter das in T-Zellen vorhandene Protein SLAT/IBP, ein zu SWAP-70 homologes Protein. Charakteristisch für SWAP-70 ist die Interaktion mit verschiedenen Phospholipiden, wie dem Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>). Weiterhin ist es in die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle, wie der Rac-GTPasen oder MAP-Kinasen involviert. Auf diese Weise beeinflusst es eine Vielzahl zellulärer Funktionen in murinen Immunzellen, wie den B-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten. Über die Bedeutung von SWAP-70 in murinen neutrophilen Granulozyten liegen bislang keine Erkenntnisse vor.

Diese Arbeit charakterisierte erstmals die funktionelle Bedeutung von SWAP-70 in der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten, die aus dem Knochenmark stammen. Für die Untersuchungen wurden neutrophile Granulozyten von Wildtyp- und homozygoten Swap-70-defizienten-Mäusen verwendet. Im Vordergrund der Untersuchungen standen zelluläre Antworten, die durch das N-Formylpeptid fMLP, ein bakterielles Tripeptid, ausgelöst wurden. Als charakteristische Antworten wurden hierbei die ROS-Produktion, die Migration, die Adhäsion an Fibrinogen sowie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts analysiert. Von Interesse war weiterhin der Einfluss von SWAP-70 auf die Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle. Besonderes Augenmerk lag auf den MAP-Kinasen p38 und p42/p44, den Rac-GTPasen sowie der Proteinkinase AKT.

Es konnte nachgewiesen werden, dass SWAP-70 an der koordinierten Weiterleitung fMLP-vermittelter Signale in murinen neutrophilen Granulozyten beteiligt ist. Es wurde gezeigt, dass SWAP-70 über die Regulierung der CD11b-Genexpression die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche beeinflusst. Wahrscheinlich moduliert SWAP-70

unter anderem über die veränderte Oberflächenlokalisierung von CD11b die Adhäsion der Zellen an Fibrinogen.

Eine weitere charakteristische Antwort muriner neutrophiler Granulozyten, in die SWAP-70 eingebunden ist, stellt die ROS-Produktion dar. Die fMLP-stimulierte ROS-Produktion der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen war gegenüber den WT-Zellen um ca. 50 % verringert. Die Vorstimulierung mit LPS oder TNF zeigte nach fMLP-Zugabe ebenfalls eine um 50 % verringerte ROS-Produktion der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen. SWAP-70 beeinflusst demnach allein über die fMLP-vermittelte Signaltransduktion die ROS-Produktion. Im Gegensatz zur ROS-Produktion und zur Adhäsion hatte SWAP-70 weder einen Einfluss auf die *in vitro*-Migration noch auf die Aktinpolymerisierung. Dies war unerwartet, da SWAP-70 in anderen murinen Immunzellen diese Antworten beeinflusst und deutet auf zelltypspezifische Funktionen hin.

Zelltypspezifische Funktionen zeigt SWAP-70 weiterhin hinsichtlich des Einflusses auf die Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle. SWAP-70 differenzierte in murinen neutrophilen Granulozyten zwischen der Rac1- und der Rac2-GTPase und begünstigte die Aktivierung der Rac2-GTPase. Die Rac1-GTPase wurde hingegen nicht beeinflusst. SWAP-70 leitet demzufolge Signale vom fMLP-Rezeptor direkt oder indirekt zur Rac2-GTPase weiter. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass SWAP-70 die Aktivierung der MAP-Kinasen p42/p44 und p38 begünstigt. Zum einen beeinflusst es die Aktivierung der Kinasen vermutlich über die Rac2-GTPase, zum anderen agiert es möglicherweise mit Proteinen innerhalb der MAP-Kinase-Kaskade. Da die Rac2-GTPase und die genannten MAP-Kinasen in die ROS-Produktion muriner neutrophiler Granulozyten involviert sind, ist denkbar, dass SWAP-70 unter anderem über diese Signalmoleküle die ROS-Produktion moduliert.

Im Gegensatz zu den MAP-Kinasen wurde die Aktivierung der PI3K $\gamma$ -abhängigen Proteinkinase AKT nicht von SWAP-70 beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass SWAP-70 nicht an der Signalweiterleitung vom fMLP-Rezeptor zur PI3K $\gamma$  beteiligt ist. Es ist vermutlich der PI3K $\gamma$  nachgeschaltet und wird durch den PI3K $\gamma$ -abhängigen intrazellulären Botenstoff PIP<sub>3</sub> beeinflusst.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass SWAP-70 ein Bestandteil der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten ist. SWAP-70 weist weiterhin zelltypspezifische Funktionen auf, was die Multifunktionalität des Signalproteins unterstreicht.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Neutrophile Granulozyten als Teil des angeborenen Immunsystems**

Zur Abwehr pathogener Mikroorganismen (z.B. Viren, Bakterien, Parasiten) besitzt der menschliche Körper verschiedene Abwehrmechanismen, wie das Immunsystem. Dabei wird zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterschieden. Die erworbene Immunantwort ist charakterisiert durch T-Zellen und antikörperbildende B-Zellen. Die angeborene Immunantwort gliedert sich in die zelluläre und azelluläre Immunreaktion. Hierbei bilden physikalische, chemische und biochemische Mechanismen sowie das Komplementsystem (Plasmaproteine) die azellulären Komponenten. Auf der zellulären Seite finden sich unter anderem Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und Granulozyten.

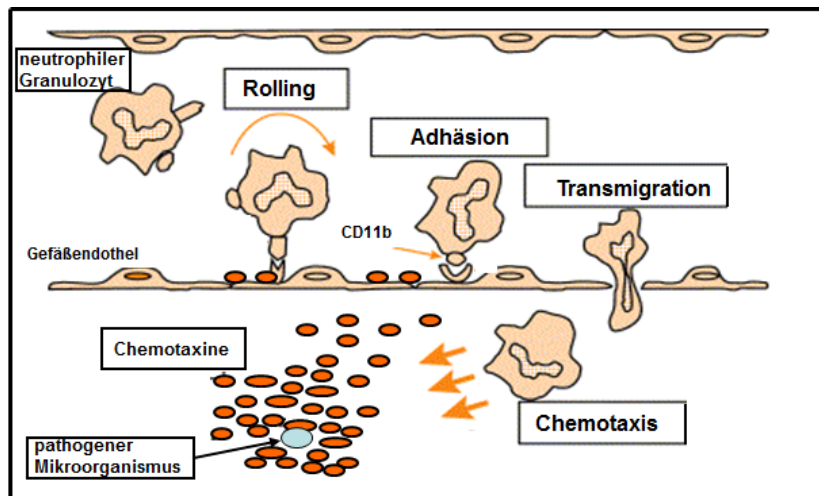
Als Bestandteil der angeborenen Immunantwort nehmen Granulozyten eine zentrale Stellung bei der unspezifischen Eliminierung von Fremdpartikeln und krankheitserregenden Mikroorganismen ein. Sie entstehen aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark (da Silva et al. 1994, Janeway et al. 2002), die sich in funktionell drei unterschiedliche Typen differenziert: die eosinophilen-, basophilen- und neutrophilen Granulozyten. Letztgenannte werden aufgrund des unregelmäßig geformten mehrfach segmentierten Zellkerns oftmals auch als polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) bezeichnet. Nach ihrer Ausreifung zirkulieren die 10 µm bis 15 µm großen neutrophilen Granulozyten im Blutkreislauf. Hier sind sie mit 50 % - 65 % die größte Population der Leukozyten. Während dieser Zirkulation befinden sie sich in einem inaktiven Zustand mit einer Halbwertszeit von rund zehn Stunden (Galbraith et al. 1965, Dancey et al. 1976, Price et al. 1996). Erfolgt währenddessen kein Kontakt mit aktivierenden Signalen, wie z.B. den sogenannten Chemotaxinen, werden sie spontan apoptotisch (Haslett 1997, Kobayashi et al. 2005). Der Kontakt mit Chemotaxinen hingegen beeinflusst die Lebensdauer sowie das Verhalten neutrophiler Granulozyten (Haslett et al. 1991, Hachiya et al. 1995).

## **2.2 Chemotaxine lösen verschiedene zelluläre Reaktionen neutrophiler Granulozyten aus**

### **2.2.1 Adhäsion und Chemotaxis**

Nach der Invasion in den Körper befinden sich pathogene Mikroorganismen meist im Gewebe und sind für die im Blutstrom zirkulierenden neutrophilen Granulozyten nicht unmittelbar erreichbar. Die pathogenen Erreger werden jedoch durch anwesende und rekrutierte Leukozyten oder Gewebezellen erkannt, die daraufhin Chemotaxine sekretieren. Ausgehend vom Sezernierungsort diffundieren diese in umliegendes Gewebe und bilden einen chemotaktischen Konzentrationsgradienten aus. Dieser Konzentrationsgradient ist ebenfalls am Endothelium des darüberliegenden Blutgefäßes vorhanden und wird durch neutrophile Granulozyten erkannt. Es kommt daraufhin zu einer schwachen reversiblen Bindung der neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen des lokalen Blutgefäßes (Abbildung 1). Die schwache reversible Bindung geht anschließend in eine stabilere Adhäsion über, die vorrangig durch Adhäsionsmoleküle der  $\beta$ 2-Integrinfamilie vermittelt wird (Harlan et al. 1991, Smith 1993, Amulic et al. 2012).  $\beta$ 2-Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine mit einer  $\alpha$ -Untereinheit (CD11) und  $\beta$ -Untereinheit (CD18) (Arnaout 1990, Harlan et al. 1991). Die Hauptintegrine neutrophiler Granulozyten sind CD11a/CD18 ( $\alpha_L\beta_2$ ; *lymphocyte function-associated antigen-1* oder LFA-1) und CD11b/CD18 ( $\alpha_M\beta_2$ ; *macrophage-1 antigen* oder Mac-1) (Burg und Pillinger 2001). Im Anschluß an die stabile Adhäsion verlassen die neutrophilen Granulozyten das Blutgefäß und dringen in subepitheliales Gewebe ein (Transmigration). Im Gewebe polarisieren sie und bilden einen vorderen Zellpol (Lamellipodium) und einen hinteren Pol (Uropodium) (Eddy et al. 2002). Am Lamellipodium wird durch das Aktinzytoskelett eine vorwärtstreibende Kraft in Richtung der steigenden Chemotaxinkonzentration generiert (Theriot und Mitchison 1991, Van Haastert und Devreotes 2004). Die neutrophilen Granulozyten migrieren zum Infektionsherd, indem sie an komplexe Makromoleküle, die sogenannten extrazellulären Matrixproteine, binden. Zur heterogenen Gruppe der extrazellulären Matrixproteine gehören unter anderem Fibrinogen, Kollagen und Laminin (Rutka et al. 1988, Bohnsack und Zhou 1992, Williams und Solomkin 1999). Die Bindung an die Matrixproteine wird unter anderem durch die  $\beta$ 2-Integrine vermittelt (Mosesson

2005). Die Migration der Zellen entlang des gebildeten chemotaktischen Konzentrationsgradienten zum Infektionsherd wird als Chemotaxis bezeichnet.



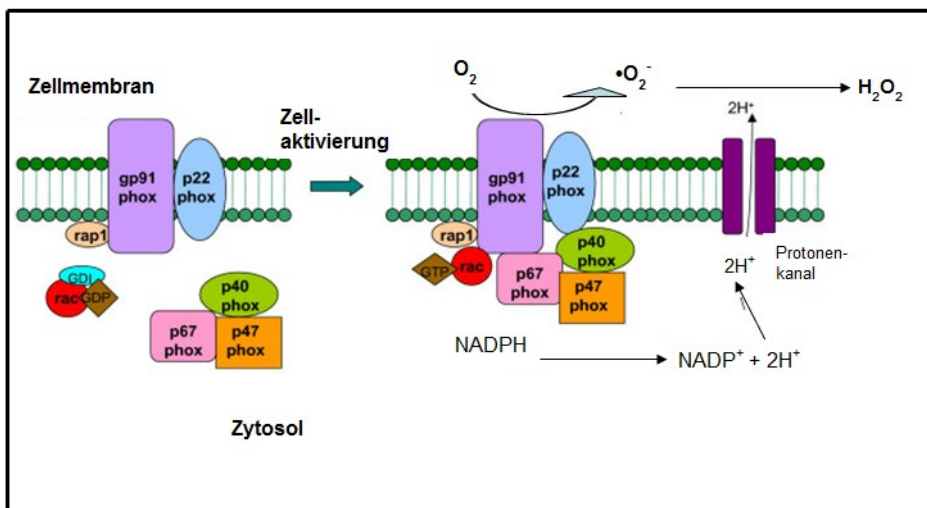
**Abbildung 1: Aktivierungskaskade neutrophiler Granulozyten (abgewandelt aus Seely et al. 2003).** Die Anwesenheit pathogener Mikroorganismen im Gewebe veranlasst unter anderem Gewebezellen Chemotaxine zu sekretieren. Die Chemotaxine diffundieren vom Infektionsherd in das umliegende Gewebe und bilden einen Konzentrationsgradienten. Dieser ist ebenfalls am Endothelium des darüberliegenden Blutgefäßes vorhanden. Neutrophile Granulozyten werden daraufhin aktiviert und rollen am Gefäßendothel entlang. Es folgt die stabile Adhäsion, die unter anderem vom  $\beta 2$ -Integrinmolekül CD11b vermittelt wird. Die Zellen verlassen das Blutgefäß (Transmigration) und wandern im Gewebe entlang des gebildeten Konzentrationsgradienten zum Infektionsherd (Chemotaxis).

### 2.2.2 Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS-Produktion)

Am Infektionsherd im Gewebe bekämpfen neutrophile Granulozyten die pathogene Ursache der inflammatorischen Reaktion unter anderem durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Fähigkeit zur ROS-Produktion wird durch einen Multienzymkomplex, die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase), gewährleistet (Babior 1999, Babior 2002). NADPH-Oxidasen bestehen aus zytosolischen und membrangebundenen Komponenten, die in ruhenden unstimulierten Zellen als nicht assoziierte Einzelkomponenten vorliegen (Abbildung 2). Auf diese Weise wird eine unkontrollierte ROS-Produktion vermieden. Die membrangebundenen Komponenten sind Rap1 und die Untereinheiten  $gp91^{phox}$  und  $p22^{phox}$ . Die zytosolischen Proteine sind  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  sowie die kleine GTPase Rac2 (Babior 1999). Nach Aktivierung der Zellen wandern die zytosolischen Komponenten zur Plasma- oder

Vesikelmembran und formen mit den membranständigen Einheiten einen funktionsfähigen NADPH-Oxidasekomplex. Daraufhin kommt es zum Transfer eines Elektrons von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) auf molekularen Sauerstoff, was zur Bildung des Superoxidanions ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) führt (Abbildung 2). Aufgrund des erhöhten Sauerstoffverbrauchs wird der Prozess auch als *oxidative/respiratory burst* bezeichnet (Babior 1984, Hampton et al. 1998). Die Bildung des schwach toxischen  $\bullet\text{O}_2^-$  ist hierbei der grundlegende Schritt bei der Entstehung von ROS, da sämtliche reaktiven Zwischenprodukte aus  $\bullet\text{O}_2^-$  entstehen können. So kann das  $\bullet\text{O}_2^-$  beispielsweise in Hydroxylradikale, Peroxidationen oder Wasserstoffperoxid überführt werden. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um hochreaktive Agenzien, die Enzyme oder Membranbestandteile von Pathogenen, aber auch von körpereigenen Zellen funktionell inaktivieren können (Klebanoff 1980).

Die NADPH-Oxidase kann neben dem ruhenden und aktiven Zustand auch in einem vorstimulierten Zustand, dem sogenannten *Priming*-Zustand, vorliegen (Sheppard et al. 2005). Im vorstimulierten Zustand bereiten Substanzen, die selbst nicht in der Lage sind die ROS-Produktion auszulösen, die NADPH-Oxidase auf den eigentlich aktivierenden Stimulus vor. Die äußerlich messbare Aktivität der NADPH-Oxidase bleibt hierbei unverändert und ähnelt dem ruhenden Zustand. Der aktive Zustand wird erreicht, wenn die vorstimulierten neutrophilen Granulozyten dem eigentlich aktivierenden Stimulus ausgesetzt werden. Die Zellen sprechen daraufhin verstärkt auf den aktivierenden Stimulus an. Dies führt zu einer höheren ROS-Produktion verglichen mit ruhenden aktivierten Zellen. Zu den *Priming*-Substanzen zählen Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) oder bakterielle Zellwandbestandteile, wie das Lipopolysaccharid (LPS) (Berkow und Dodson 1988, DeLeo et al. 1998).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der NADPH-Oxidase und Bildung des Superoxidanions ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) nach Aktivierung der Zellen (abgewandelt aus Assari 2006).** Im aktiven Zustand der Zellen translozieren die zytosolischen Komponenten ( $\text{p47}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p67}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p40}^{\text{phox}}$ , Rac2-GTPase) zur Zell- oder Vesikelmembran und bilden mit den membrangebundenen Komponenten (Rap1,  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  und  $\text{p22}^{\text{phox}}$ ) den funktionsfähigen NADPH-Oxidasekomplex. Daraufhin kommt es zum Transfer eines Elektrons von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) auf molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ). Es entsteht das Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), das anschließend in hochreaktive Verbindungen, wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), überführt wird.

### 2.3 Das N-Formylpeptid fMLP-ein Chemotaxin neutrophiler Granulozyten

Die unter 2.2 aufgeführten zellulären Antworten neutrophiler Granulozyten werden unter anderem durch bakterielle N-formylierte Peptide, wie das Tripeptid N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) ausgelöst. N-formylierte Peptide stellen mitunter die am längsten bekannte Gruppe chemotaktischer Faktoren dar (Schiffmann et al. 1975, Prossnitz und Ye 1997, Panaro und Mitolo 1999, Le und Murphy 2002). Charakteristisch für diese Peptide ist die N-terminale Formylgruppe, was chemisch gesehen eine Aldehydgruppe ( $\text{H-C=O}$ ) ist. Bakterien benötigen N-formylierte Peptide zur Initiierung ihrer Proteinsynthese und sezernieren diese ebenfalls *in vivo* (Schiffmann et al. 1975). Das bakterielle Tripeptid fMLP bindet an die Formylpeptid Rezeptoren 1 und 2 (FPR1 und FPR2/ALX) auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten und löst dadurch eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade aus (Panaro et al. 2006, Ye et al. 2009). FPR1 und FPR2/ALX, die neben fMLP auch nicht formylierte Peptide erkennen, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Ye et al. 2009).

Als Mitglieder der GPCR-Rezeptorfamilie weisen FPR1 und FPR2/ALX die typische siebenschleifige transmembranöse  $\alpha$ -Helixdomäne auf (Gether 2000, Oldham und Hamm 2008). An der intrazellulären Membranseite interagieren diese Rezeptoren mit heterotrimeren G-Proteinen, die aus der  $G\beta\gamma$ - und der  $G\alpha_i$ -Untereinheit bestehen (Simon et al. 1991, Ye et al. 2009). An die  $G\alpha_i$ -Untereinheit ist Guanosindiphosphat (GDP) gebunden und im Falle der Interaktion von fMLP mit den Rezeptoren erfolgt der Austausch von GDP gegen Guanosintriphosphat (GTP) (Offermanns 2003). Daraufhin dissoziiert das heterotrimere G-Protein in das  $G\beta\gamma$ -Dimer und die  $G\alpha_{iGTP}$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten modulieren nun unabhängig voneinander die Aktivität intrazellulärer Effektoren, die wiederum an der Regulierung verschiedener Zellaktivitäten beteiligt sind (Ford et al. 1998, Offermanns 2003). Die GTP-tragende  $G\alpha_i$ -Untereinheit inhibiert beispielsweise die Aktivität der Adenylylcyclasen. Die Bildung des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat wird dadurch gehemmt.  $G\beta\gamma$ -Dimere aktivieren unter anderem die Phosphatidylinositol-3-Kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ), die daraufhin verschiedene Phosphoinositide phosphoryliert. Auf diese Weise entsteht aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) der sekundäre Botenstoff Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) (Sasaki et al. 2000). Das PIP<sub>3</sub> beeinflusst wiederum die Lokalisierung und die Aktivität nachgeschalteter Signalproteine, beispielsweise die der Serin/Threonin-Proteinkinase AKT (Sasaki et al. 2000, Hirsch et al. 2000). AKT phosphoryliert und inhibiert die Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Cross et al. 1995).

Weitere intrazelluläre Signalmoleküle, die durch die fMLP-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst werden, sind die *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*-GTPasen (Rac-GTPasen) sowie die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) (Thompson et al. 1994, Zu et al. 1998, Akasaki et al. 1999, Benard et al. 1999).

### **2.3.1 Die Funktion der MAP-Kinasen**

Ein Hauptweg auf dem extrazelluläre Signale in intrazelluläre Antworten umgesetzt werden, verläuft über die MAP-Kinasen. Extrazelluläre Signale sind beispielsweise Wachstumsfaktoren, Chemokine, Stress-Signale oder inflammatorische Substanzen (Torres et al. 1993, Thompson et al. 1994, Zu et al. 1998). Diese aktivieren die MAP-Kinasen über eine strikt regulierte Kinase-Kaskade. Die MAP-Kinasen werden hierbei durch die MAP-



Kinasen-Kinasen phosphoryliert, die wiederum von MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen beeinflusst werden. Zu den MAP-Kinasen zählen unter anderem die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2 oder p42/p44) und p38. In neutrophilen Granulozyten sind sie für eine Vielzahl zellulärer Reaktionen von Bedeutung. So beeinflussen die MAP-Kinasen über die Phosphorylierung von p47<sup>phox</sup> die ROS-Produktion (El Benna et al. 1996, Dewas et al. 2000). Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei der Degranulierung, Zytokinsekretion und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (Zu et al. 1998, Heuertz et al. 1999, Mócsai et al. 2000).

### **2.3.2 Die Funktion der Rac-GTPasen**

Die Rac-GTPasen stellen eine Subfamilie der Rho-GTPasen, bestehend aus RhoG sowie den Isoformen Rac1, Rac2 und Rac3 dar (Vega und Ridley 2007). Die Rac1-GTPase wird ubiquitär exprimiert (Didsbury et al. 1989). Das Vorkommen der Rac2-GTPase ist auf das hämatopoetische System begrenzt (Shirsat et al. 1990). Die Rac3-Isoform wird überwiegend im Nervensystem, aber auch im Pankreas oder in der Lunge exprimiert (Haataja et al. 1997).

Die Rac-GTPasen fungieren als molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zirkulieren (Boguski and McCormick 1993). Nur im aktiven Zustand sind sie in der Lage mit den entsprechenden Effektorproteinen zu interagieren, wodurch eine Signalweiterleitung erfolgt. Die GTP- bzw. GDP-Beladung der Rac-GTPasen wird durch regulatorische Proteine gewährleistet. Hierbei überführen die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) die Rac-GTPasen in den inaktiven GDP-gebundenen Zustand (Lamarche und Hall 1994). Die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beschleunigen die Dissoziation des GDPs und stabilisieren den nukleotidfreien Zustand der Rac-GTPasen, bis GTP gebunden wird (Cerione und Zheng 1996, Zheng 2001). Die Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) stabilisieren hingegen die inaktive zytosolische Form der Rac-GTPasen (Olofsson 1999).

In humanen neutrophilen Granulozyten ist die Rac2-GTPase die dominierende Isoform (Heyworth et al. 1994). In murinen neutrophilen Granulozyten werden die Rac1- und die Rac2-Isoform hingegen zu gleichen Teilen exprimiert (Li et al. 2002).

Verschiedene Rac1- und/oder Rac2- Knockout Mausmodelle untersuchten die Bedeutung der Rac-Isoformen in zellulären Funktionen neutrophiler Granulozyten (Roberts et al. 1999, Kim und Dinauer 2001, Li et al. 2002, Glogauer et al. 2003, Sun et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Rac2-GTPase die dominierende Isoform für die Aktivierung der NADPH-Oxidase in humanen und murinen neutrophilen Granulozyten ist (Roberts et al. 1999, Williams et al. 2000, Kim und Dinauer 2001, Li et al. 2002, Glogauer et al. 2003). Weitere zelluläre Reaktionen, wie die Migration und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, benötigen die Aktivität beider Rac-Isoformen (Roberts et al. 1999, Gu et al. 2003, Glogauer et al. 2003, Sun et al. 2004).

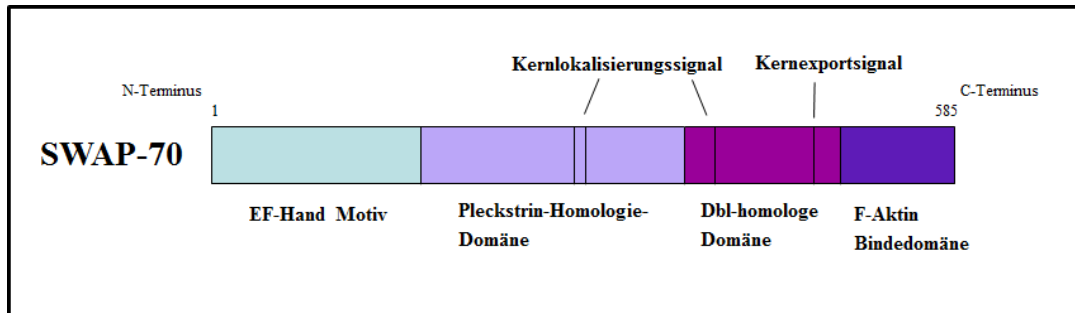
## **2.4 Das *switch-associated protein 70* (SWAP-70)**

### **2.4.1 Struktur und Expression**

SWAP-70 wurde ursprünglich aus reifen B-Zellen isoliert und als Bestandteil eines nukleären Multiproteinkomplexes charakterisiert (Borggreffe et al. 1998). Der Multiproteinkomplex ist in DNA-Rekombinationsereignisse involviert, die zum Immunglobulinklassenwechsel (Ig-Klassenwechsel) in B-Zellen führen.

Das Swap-70 Gen ist in humanen Zellen auf dem Chromosom 11p15.2 und in murinen Zellen auf dem Chromosom 7 lokalisiert (Masat et al. 2000). Die DNA kodiert ein Protein, das aus 585 Aminosäuren besteht und eine molekulare Masse von 70 kDa aufweist. Das Protein hat verschiedene Domänen (Abbildung 3): Im N-terminalen Bereich befindet sich das sogenannte EF-Hand Motiv, ein Helix-Loop-Helix-Motiv, welches die Bindung von Calciumionen ermöglicht. Daran schließt sich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne an, die verschiedene Phospholipide, unter anderem PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub>, binden kann (Shinohara et al. 2002, Hilpelä et al. 2003, Wakamatsu et al. 2006). Die Bindung an PIP<sub>3</sub> ist wichtig für die Translokation zur Plasmamembran sowie für die Funktion des Proteins (Wakamatsu et al. 2006). Der Pleckstrin-Homologie-Domäne folgt eine Region, die eine limitierte Sequenzhomologie zur Dbl-homologen-Domäne aufweist (Shinohara et al. 2002, Rossman et al. 2005). Die Bedeutung der Dbl-Homologie-Domäne wird unter 2.4.2 näher betrachtet. Im C-terminalen Bereich von SWAP-70 ist weiterhin eine Bindedomäne für filamentöses Aktin (F-Aktin) lokalisiert. Aufgrund der Bindung an F-Aktin ist SWAP-70 in einer

Fibroblastenzelllinie in die Bildung von Membranausstülpungen involviert (Ihara et al. 2006). Es existieren außerdem nukleäre Import- bzw. Exportsignalsequenzen innerhalb der Domänenstruktur von SWAP-70. Diese ermöglichen eine Änderung der subzellulären Lokalisierung von SWAP-70.



**Abbildung 3: Domänenstruktur des Proteins SWAP-70.** Im N-terminalen Bereich besitzt SWAP-70 ein EF-Hand Motiv. Daran schließt sich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne an. Dieser folgt eine Dbl-homologe Domäne. Im C-Terminus ist eine Bindedomäne für filamentöses Aktin (F-Aktin) lokalisiert. Die Kernlokalisierungs- und Kernexportsequenzen ermöglichen eine Änderung der subzellulären Lokalisierung von SWAP-70.

SWAP-70 wird in einer Vielzahl von Geweben, Osteoklasten sowie murinen und humanen Immunzellen synthetisiert (Ishikawa et al. 1998, Borggreffe et al. 1999, Garbe et al. 2012, Bahaie et al. 2012). Bezüglich der murinen Immunzellen existiert ein zelltypspezifisches Expressionsmuster. SWAP-70 wird hierbei in B-Zellen, Mastzellen, dendritischen Zellen und eosinophilen Granulozyten, jedoch nicht in T-Zellen und Makrophagen synthetisiert (Borggreffe et al. 1999, Borggreffe et al. 2001, Gross et al. 2002, Oberbanscheidt et al. 2007, Bahaie et al. 2012,). T-Zellen besitzen ein zu SWAP-70 homologes Protein, das als *SWAP-70-like adapter of T cells/ IRF-4-binding protein* (SLAT/IBP) bezeichnet wird (Tanaka et al. 2003). Bislang liegen keine Erkenntnisse über die Funktion von SWAP-70 in neutrophilen Granulozyten vor.

#### 2.4.2 SWAP-70 und die GEFs der Dbl-Proteinfamilie

Die meisten der bisher bekannten GEFs der Rho-GTPasen in Säugern gehören überwiegend zur Dbl-Proteinfamilie (Hart et al. 1994, Zheng 2001, Rossman et al. 2005). Die GEF-Aktivität dieser Proteinfamilie wird durch die Dbl-homologe-Domäne vermittelt (Hart et al. 1994, Schmidt und Hall 2002). Fast alle Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen eine C-terminal von der Dbl-homologen-Domäne gelegene Pleckstrin-Homologie-

Domäne auf. Pleckstrin-Homologie-Domänen können sowohl mit Proteinen als auch mit Phospholipiden der Plasmamembran interagieren, so dass für diese Domänen verschiedene regulatorische Mechanismen angenommen werden (Rebecchi und Scarlata 1998, Lemmon und Ferguson 2000). Das gemeinsame Charakteristikum von GEFs der Dbl-Proteinfamilie liegt in der Dbl-Homologie-Pleckstrin-Homologie-Domänenstruktur (Cerione und Zheng 1996, Whitehead et al. 1997). In ihrer übrigen molekularen Struktur sind sie hochvariabel und besitzen weitere Proteindomänen, die für die jeweilige Funktion des GEFs von Bedeutung sind.

Im Gegensatz zu den GEFs der Dbl-Proteinfamilie liegt die Pleckstrin-Homologie-Domäne von SWAP-70 N-terminal der Dbl-Homologie-Domäne. SWAP-70 besitzt somit eine Pleckstrin-Homologie-Dbl-Homologie-Domänenstruktur (Rossman et al. 2005). Ein weiteres Protein mit dieser Domänenstruktur ist SLAT/IBP. Beide Proteine werden daher einer eigenen Proteinfamilie zugeordnet (Gupta et al. 2003, Rossman et al. 2005). SLAT/IBP zeigt eine GEF-Aktivität für die Rac-GTPase und die Cdc42-GTPase (Gupta et al. 2003). Die Dbl-Homologie-Domäne von SWAP-70 weist *in vitro* eine GEF-Aktivität für die Rac1-GTPase auf (Shinohara et al. 2002). In Abhängigkeit des Zelltypes unterstützt oder hemmt SWAP-70 die Aktivierung der Rac-GTPase und weiterer Rho-GTPasen, wie RhoA (Sivalenka und Jessberger 2004, Ocana-Morgner et al. 2009, Ocana-Morgner et al. 2011, Ocana-Morgner et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Oberbanscheidt weder *in vivo* noch *in vitro* eine GEF-Aktivität von SWAP-70 für die Rac-GTPase demonstrieren (Oberbanscheidt et al. 2007).

### **2.4.3 Funktionen von SWAP-70 in murinen Immunzellen**

#### **2.4.3.1 SWAP-70 in murinen B-Zellen**

B-Zellen sind Teil der erworbenen Immunantwort und dienen der spezifischen Abwehr pathogener Mikroorganismen. Sie erkennen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene von Bakterien, Viren und anderen krankheitserregenden Organismen und bilden Antikörpermoleküle, sogenannte Immunglobuline, gegen diese Antigene. Als Bestandteil des nukleären Multiproteinkomplexes ist SWAP-70 in den Ig-Klassenwechsel zum IgG sowie zum IgE involviert (Masat et al. 2000, Borggreffe et al. 2001). Weiterhin transloziert

SWAP-70 in Abhängigkeit der Aktivierung der B-Zellen vom Zytoplasma zur Plasmamembran (Masat *et al.*, 2000). Dort interagiert es unter anderem mit dem B-Zellrezeptor und wandert anschließend in den Zellkern (Masat *et al.* 2000). Neben der Bedeutung für den Ig-Klassenwechsel ist SWAP-70 in weitere zelluläre Reaktionen der B-Zellen eingebunden. So wird unter anderem die Migration muriner B-Zellen in die Lymphknoten von SWAP-70 beeinflusst (Pearce *et al.* 2006). Im Vergleich zu den Wildtyp (WT)-B-Zellen zeigen Swap-70-defiziente (Swap-70<sup>-/-</sup>) B-Zellen eine verringerte Migration in die Lymphknoten (Pearce *et al.* 2006). Die verminderte Migration geht in den Swap-70<sup>-/-</sup>-B-Zellen mit einer veränderten Adhäsion sowie Defekten in der Polarisierung einher (Pearce *et al.* 2006).

#### **2.4.3.2 SWAP-70 in murinen Mastzellen**

Mastzellen übernehmen als Effektorzellen der angeborenen Immunantwort Funktionen bei der Abwehr von Parasiten und bei der Auslösung allergischer Entzündungen. Hierfür besitzen sie auf ihrer Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren, unter anderem den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI). Die antigenvermittelte Quervernetzung von FcεRI führt zur Aktivierung der Mastzelle mit Degranulation (Kitaura *et al.* 2003). SWAP-70 ist sowohl in die FcεRI-vermittelte Degranulation als auch in die Reifung muriner Mastzellen eingebunden (Gross *et al.* 2002). Es beeinflusst hierbei die Transkription und Freisetzung verschiedener Zytokine über die Regulierung der Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 sowie der Serin/Threonin-Proteinkinase AKT (Sivalenka *et al.* 2008).

Weiterhin ist SWAP-70 in die c-Kit-vermittelte Signaltransduktion, die für proliferative Ereignisse und Differenzierungsprozesse muriner Mastzellen verantwortlich ist (Broudy 1997, Ashman 1999), eingebunden. Es beeinflusst hierbei die Migration, die Reorganisation des Aktinzytoskeletts sowie die Adhäsion aktivierter Mastzellen (Sivalenka und Jessberger 2004). Dies geschieht unter anderem über die Beeinflussung der Aktivierung der Rac1- und Rac2-GTPase, der MAP-Kinase p42/p44 sowie der Proteinkinase AKT (Sivalenka und Jessberger 2004).

### **2.4.3.3 SWAP-70 in murinen dendritischen Zellen**

Dendritische Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie sind darauf spezialisiert Antigene aufzunehmen und den T-Lymphozyten zur Erkennung zu präsentieren. Die Zellen wandern vom Blut ins Gewebe und nehmen dort unspezifisch gelöste Moleküle, Antigene oder Pathogene auf. Daraufhin präsentieren sie auf der Zelloberfläche bestimmte Peptidfragmente der aufgenommenen Proteine über den *major histocompatibility complex II* (MHC-Klasse II). Der Transport der MHC-Klasse II Moleküle auf die Zelloberfläche wird unter anderem durch SWAP-70 beeinflusst (Ocana-Morgner et al. 2009). Hierbei nimmt SWAP-70 über die Regulierung der Aktivierung der RhoA-GTPase Einfluss auf diesen zellulären Prozess (Ocana-Morgner et al. 2009). Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist ein weiterer zellulärer Prozess muriner dendritischer Zellen, in den SWAP-70 eingebunden ist (Ocana-Morgner et al. 2009). Weiterhin zeigt SWAP-70 eine Bedeutung in der GPCR-vermittelten Signaltransduktion. Die Stimulierung muriner dendritischer Zellen mit dem GPCR Agonisten Sphingosine 1-Phosphat demonstriert einen Einfluss von SWAP-70 auf die Migration und die Endozytose (Ocana-Morgner et al. 2011).

### **2.4.3.4 SWAP-70 in murinen eosinophilen Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten gehören zum angeborenen Immunsystem und sind an zahlreichen Entzündungsprozessen, wie allergischen Erkrankungen der Atemwege, beteiligt. Die im Mausmodell induzierte allergische Atemwegserkrankung zeigt eine verringerte Rekrutierung von Swap-70<sup>-/-</sup>-eosinophilen Granulozyten in die bronchoalveoläre Lungenflüssigkeit im Vergleich zu WT-eosinophilen Granulozyten (Bahaie et al. 2012). Diese verminderte Rekrutierung der Zellen in die Lungenflüssigkeit geht mit einer veränderten Chemokin-induzierten Migration sowie Polymerisierung/Depolymerisierung von Aktinstrukturen einher (Bahaie et al. 2012). Weiterhin moduliert SWAP-70 die Adhäsion eosinophiler Granulozyten an vaskuläre Adhäsionsmoleküle sowie die Verteilung von CD11b/CD18 auf der Zelloberfläche (Bahaie et al. 2012).

## **2.5 Zielstellung der Arbeit**

SWAP-70 wurde in einer Vielzahl von Geweben aber auch Osteoklasten sowie murinen und humanen Immunzellen nachgewiesen. Es bindet verschiedene Phospholipide, unter anderem PIP<sub>3</sub>, und moduliert die Aktivierung verschiedener Rho-GTPasen und intrazellulärer Signalmoleküle. Die meisten der bisher identifizierten Funktionen von SWAP-70 beziehen sich auf murine Immunzellen, wie B-Zellen, Mastzellen, dendritische Zellen und eosinophile Granulozyten. Über die Bedeutung von SWAP-70 in zellulären Reaktionen neutrophiler Granulozyten liegen bislang keine Erkenntnisse vor. Neutrophile Granulozyten sind Teil des angeborenen Immunsystems und dienen der initialen Abwehr invasiver Erreger. Sie werden durch eine Vielzahl von Chemotaxinen aktiviert. Die N-Formylpeptide stellen hierbei mitunter die am längsten bekannte Gruppe von Chemotaxinen dar. Ein bedeutendes N-Formylpeptid ist das bakterielle Tripeptid fMLP.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von SWAP-70 in der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten des Knochenmarks. Für die Untersuchungen wurden neutrophile Granulozyten von WT- und homozygoten Swap-70-defizienten (Swap-70<sup>-/-</sup>)-Mäusen genutzt. Die Zellen wurden hierfür mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP stimuliert und charakteristische Antworten wurden untersucht. Zu den untersuchten zellulären Antworten zählten die ROS-Produktion, die Adhäsion an Fibrinogen, die Migration sowie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Für diese zellulären Antworten werden die Aktivitäten verschiedener intrazellulärer Signalproteine, unter anderem die der Rac1- und Rac2-GTPase, der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 sowie der Serin/Threonin Proteinkinase AKT und GSK3 $\beta$  benötigt. Die Analyse des Aktivierungsstatus der genannten Signalproteine sollte Aufschluss über einen möglichen Einfluss von SWAP-70 auf diese Effektorproteine geben.

### **3 Material**

#### **3.1 Versuchstiere**

Die Mausstämme (*Mus musculus*) wurden, soweit nicht anders angegeben, unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) vom Institut für Versuchstierkunde in Jena gezüchtet. Der homozygote Knockoutstamm wurde von der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Tierantragsnummer: 24-9168.11-1/2011-13) bezogen. Für die Experimente wurden männliche und weibliche Tiere im Alter von neun bis zwölf Wochen mit C57BL/6 als genetischen Hintergrund genutzt. Es wurden folgende Mausstämme verwendet:

<u>Mausstamm</u>	<u>Herkunft</u>
C57BL/6 (J-Stamm) = Wildtypstamm (WT)	Jackson Laboratory, Sulzfeld, Deutschland
Swap-70 <sup>-/-</sup> -Stamm = homozygoter Knockoutstamm	TU Dresden, Deutschland, (Borggreffe et al. 2001)

#### **3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
- 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, 1 M)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
- bovines Serumalbumin (BSA) endotoxin-free, fatty acid-poor	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
- CL-Glutathione ChroMatrix (6 %), PAK1B-CRIB <sup>GST</sup>	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Formaldehyd	Hollborn und Söhne, Leipzig, Deutschland



<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
- Fibrinogen, Guanosindiphosphat (GDP), Guanosin-5'-O-[ $\gamma$ -thio]triphosphat (GTP $\gamma$ S)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- High capacity RNA-to-cDNA Kit, TaqMan Universal PCR Master Mix, CD11b und GAPDH TaqMan Gene Expression Assay Mix (20X)	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
- N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-Phalloidin (NBD-Phalloidin)	Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
- N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Nonidet P-40 (NP-40)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
- Percoll	GE Healthcare, München, Deutschland
- Pierce ECL-Western-Blotting-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
- RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
- Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland

### **3.3 Geräte, sonstige Materialien, Software-Programme**

<u>Geräte, sonstige Materialien, Software-Programme</u>	<u>Hersteller- bzw. Vertriebsfirma</u>
- ABI 7500 System, SDS v1.3 Software	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
- Brutschrank (CO <sub>2</sub> -Inkubator)	SANYO Sales & Marketing Europe, München, Deutschland
- Cell-Quest-Pro-Software 4.0.2	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

<u>Geräte, sonstige Materialien, Software-Programme</u>	<u>Hersteller- bzw. Vertriebsfirma</u>
- Corning® 96-Loch Mikrotiterplatten EIA/RIA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Duomax 1030, wippender Plattformschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
- Durchlichtmikroskop (TELAVAL 3)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Einmalinjektionskanüle (0,5 x 16 mm), Einmalspritzen (2 ml, 10 ml)	Braun AG, Melsungen, Deutschland
- ELISA-Reader	Molecular Devices GmbH, Biberbach an der Riß, Deutschland
- FACScan, FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Gel Blotting Papier, GB004	Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- Glasplatten (7,3 cm x 10,1 cm)	Bio-Rad, München, Deutschland
- HB-130 (Heizblock-130)	Unitek Industrie Elektronik, Leutenbach-Nellmersbach, Deutschland
- Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
- Luminometer LB 96V	Berthold Technologies, Bad Wildbach, Deutschland
- Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- MicroAmp optische 96-Loch Reaktionsplatte	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
- MicroLumat Plus LB 96V	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
- Mini-Blot Apparatur, Minigelsystem (Mini-Protean 3)	Bio-Rad, München, Deutschland
- MF-ChemiBIS 3.2	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
- Nanodrop-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA

<u>Geräte, sonstige Materialien, Software-Programme</u>	<u>Hersteller- bzw. Vertriebsfirma</u>
- Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
- Opti Plates™ - 96	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
- Polypropylenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
- Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Transfermembran (Amersham Hybond-P)	GE Healthcare, München, Deutschland
- QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
- Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
- Rotator SB3	VWR International, Darmstadt, Deutschland
- TotalLab Software	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
- Tank-Blot-System	Bio-Rad, München, Deutschland
- Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Transwell-Migrationssystem (3 µm Porengröße)	Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland
- Zellsieb (70 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Zentrifuge 5804R, Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### **3.4 Stimulantien und Hemmstoffe**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
- fMLP, LPS aus <i>E. coli</i> Serotyp O55:B5, Aprotinin, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Natriumorthovanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ), Cytochalasin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
- Pepstatin A	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
- Leupeptin, Chymostatin, Benzamidin	Serva, Heidelberg, Deutschland

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
- 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- rekombinantes murines TNF $\alpha$	Jena Bioscience, Jena, Deutschland

### **3.5 Zellkulturmedien, Lösungen und Stammlösungen**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle/Zusammensetzung</u>
- Hanks-Balanced-Salt-Solution (HBSS), 1-fach mit/ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , ohne Phenolrot	PAA Laboratories, Cölbe Deutschland
- Fibrinogen-Lösung	20 $\mu$ g/ml in HBSS
- BSA-Lösung	1 mg/ml in HBSS
- HBSS 10-fach, ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , ohne Phenolrot	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
- Kristallviolett-Lösung	5 mg/ml in 2 % Ethanol
- LPS-Stammlösung	1 mg/ml HBSS 1-fach
- rekombinante murine TNF $\alpha$ -Stammlösung	3,4 mg/ml HBSS 1-fach
- Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	1 % (w/v) in <i>aqua bidest.</i>
- fMLP-Stammlösung	10 <sup>-3</sup> M in DMSO
- Cytochalasin B-Stammlösung	2 x 10 <sup>-4</sup> M in DMSO
- Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung	20 % (w/v) in <i>aqua bidest.</i>
- GDP-Stammlösung	1 mM in <i>aqua bidest.</i>
- GTP $\gamma$ S-Stammlösung	10 mg/ml in <i>aqua bidest.</i>

### **3.6 Herstellung verschiedener Percoll-dichten**

Percoll mit einer spezifischen Dichte von 1,130 g/ml bei Raumtemperatur wurde in einem Verhältnis 10:1 mit HBSS 10-fach verdünnt und damit in einen isotonen Zustand gebracht. Ausgehend von dieser 100 %igen Percoll-Lösung wurden die benötigten Percoll-dichten durch Verdünnung mit 1-fach HBSS (ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Phenolrot) hergestellt (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Herstellung der Percoll-dichten.**

Zieldichte des Percolls in g/ml (entspricht % Percoll)	Percoll in ml	HBSS 10-fach in ml	HBSS 1-fach in ml
1,124 (100)	29,7	3,3	-
1,081 (65)	16	-	9
1,093 (75)	15	-	5

### 3.7 Antikörper

#### 3.7.1 primäre Antikörper

**Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper (AK) für Western Blot (WB) und Durchflusszytometrie (FACS). Die hier aufgeführten primären AK wurden aus Städten bezogen, die innerhalb von Deutschland liegen.**

AK	Spezies des Spendertiers	Antigen/Markierung/Klon	Bezugsquelle	Verdünnung (Einsatz)
SWAP-70	Schaf, polyklonal	Sc-10883, E-16	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg	1:2000 (WB)
phospho-AKT	Kaninchen, monoklonal	Serin 473, 193H12	Cell Signaling, Frankfurt a. M.	1:2000 (WB)
AKT	Kaninchen, monoklonal	total AKT-Protein, 11E7	Cell Signaling, Frankfurt a. M.	1:2000 (WB)
phospho-p38 MAPK	Kaninchen, monoklonal	Threonin180/Tyrosin182, 3D7	Cell Signaling, Frankfurt a. M.	1:2000 (WB)
p38-MAPK	Kaninchen, polyklonal	p38 $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ MAPK-Protein	Cell Signaling, Frankfurt a. M.	1:2000 (WB)
phospho-p42/44	Kaninchen, monoklonal	Threonin202/Tyrosin204, 197G2	Cell Signaling, Frankfurt a. M.	1:2000 (WB)
p42/44	Maus, monoklonal	p42/44; 16/ERK	BD Bioscience, Heidelberg,	1:2000 (WB)
phospho-GSK-3 $\beta$	Kaninchen, monoklonal	Serin 9; D85E12	Cell Signaling, Frankfurt a. M.	1:2000 (WB)
Rac2	Kaninchen, polyklonal	Sc-96, C-11	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg	1:1000 (WB)
Rac1	Kaninchen, polyklonal	Sc-95, C-11	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg	1:1000 (WB)
CD11b	Ziege, polyklonal	Sc-6614, M-19	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg	1:2000 (WB)
Aktin	Ziege, polyklonal	Sc-1616, I-19	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg	1:2000 (WB)
Vinculin	Ziege, polyklonal	Sc-7648, C-20	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg	1:2000 (WB)
CD11b	Ratte, monoklonal	Maus CD11b/PE, M1/70.15	eBioscience, Aachen	1:200 (FACS)

AK	Spezies des Spendertiers	Antigen/Markierung/Klon	Bezugsquelle	Verdünnung (Einsatz)
Gr-1	Ratte, monoklonal	Maus Gr-1/FITC, RB6-8C5	ImmunoTools, Friesoythe	1:200 (FACS)
fMLP-Rezeptor	Maus, monoklonal	5F1	BD Pharmingen, Heidelberg	1:200 (FACS)

### 3.7.2 sekundäre Antikörper und Isotypenkontrollen

**Tabelle 3: Verwendete sekundäre Antikörper (AK) für Western Blot (WB) bzw. die Isotypenkontrollen für die Durchflusszytometrie (FACS). Die hier aufgeführten sekundären AK und Isotypenkontrollen wurden aus Städten bezogen, die innerhalb von Deutschland liegen.**

AK-	Spezies des Spendertiers	Antigen/Markierung/Klon	Bezugsquelle	Verdünnung (Einsatz)
Ziege-anti-Maus IgG	Ziege polyklonal	Maus IgG/Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Kierkegaard und Perry Laboratories, Wedel	1:10000 (WB)
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	Kaninchen IgG/Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Kierkegaard und Perry Laboratories, Wedel	1:10000 (WB)
Esel-anti-Ziege-IgG	Esel, polyklonal	Ziege IgG/Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg	1:10000 (WB)
IgG2a, kappa	Ratte monoklonal	IgG2a/FITC, RTK 2758	Biozol, Eching	1:200 (FACS)
IgG2b, kappa	Ratte monoklonal	IgG2b,kappa/FITC; TBE 15	Biozol, Eching	1:200 (FACS)
IgG2b	Ratte monoklonal	Maus IgG2b/PE, TBE 15	eBioscience, Aachen	1:200 (FACS)
IgG1, kappa	Monoklonal Maus	MOPC-21	BD Pharmingen, Heidelberg	1:200 (FACS)

### 3.8 Puffer und Zellkulturmedien

Medium I HBSS 1-fach ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ohne Phenolrot; 25 mM HEPES; 2 mM EDTA

Medium II HBSS 1-fach mit  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ohne Phenolrot; 25 mM HEPES

Reaktionsmedium	HBSS 1-fach ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , ohne Phenolrot; 25 mM HEPES; 1 % BSA
Lysispuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0; 137 mM NaCl; 27 mM KCl; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 % (v/v) Glycerol; 1 % (v/v) NP-40; 1 mM PMSF; 5 µg/ml Leupeptin; 5 µg/ml Pepstatin A; 5 µg/ml Benzamidin; 21 µg/ml Aprotinin; 12 µg/ml Chymostatin; 12 µg/ml AEBSF; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
<i>Pulldown</i> -Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM EGTA; 1 % (v/v) NP-40; 10 % (v/v) Glycerol; 200 µg PAK1B-CRIB <sup>GST</sup> ; 100 µM GDP; Protease- und Phosphataseinhibitoren siehe Lysispuffer
Probenauftragspuffer (5-fach)	2,5 M Tris-HCL pH 6,8; 10 % (v/v) SDS; 58 % (v/v) Glycerin; 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,5 % (v/v) Bromphenolblau
Sammelgel (5 %ig)	2,8 ml <i>aqua dest.</i> ; 1,2 ml 4-fach Sammelgelpuffer; 0,8 ml Acrylamid/Bisacrylamid (29:1); 64 µl APS-Lösung; 6 µl TEMED
Trenngel	<b>10 %:</b> 6 ml <i>aqua dest.</i> ; 3,6 ml Trenngelpuffer (4-fach); 4,8 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1); 64 µl APS-Lösung; 16 µl TEMED <b>15 %:</b> 3,6 ml <i>aqua dest.</i> ; 3,6 ml Trenngelpuffer (4-fach); 7,2 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1); 64 µl APS-Lösung; 16 µl TEMED
Trenngelpuffer (4-fach)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 2 % (v/v) SDS

Sammelgelpuffer (4-fach)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % (v/v) SDS
Elektrophoresepuffer (10-fach)	250 mM Tris-HCl pH 8,3; 2,5 M Glycin; 1 % (v/v) SDS
NET-G-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05 % (v/v) Tween 20; 0,05 % (v/v) Gelatine
Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCL pH 8,3; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 2 % (v/v) SDS; 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
NBD-Puffer ( $3,7 \times 10^7$ M)	1,5 ml NBD-Phalloidin in 1,5 ml Ethanol; 3 ml Formaldehyd (37 %ig); 10,5 ml PBS; 3 mg Lysophosphatidylcholin
Blocking-Puffer	1 % (w/v) BSA in HBSS

## **4 Methoden**

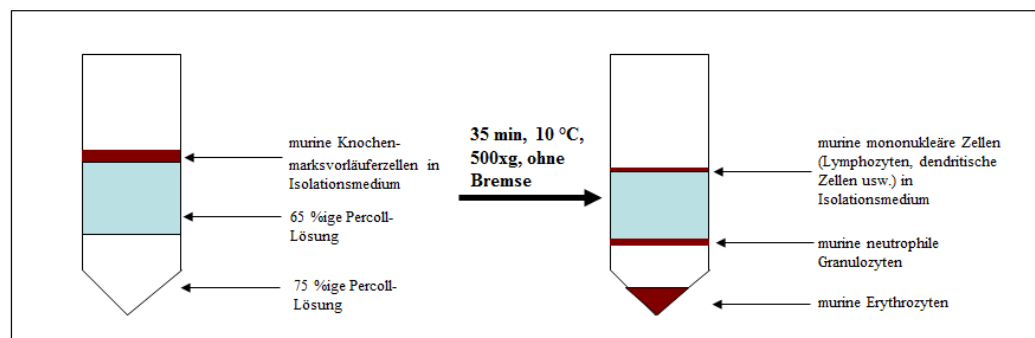
### **4.1 Zellbiologische Methoden**

#### **4.1.1 Gewinnung und Anreicherung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark von Mäusen**

Bei der Gewinnung muriner neutrophiler Granulozyten wurden die einschlägigen Verhaltensregeln beachtet, um steriles Arbeiten zu gewährleisten: Die benötigten Instrumente (Pinzetten, Scheren) zur Präparation wurden bei 121 °C für 20 min bei 1 bar autoklaviert. Die verwendeten Medien wurden sterilfiltriert.



Für die Gewinnung neutrophiler Granulozyten wurden Mäuse im Alter von neun bis zwölf Wochen mittels Etherinhalation getötet. Nach anschließender Fixierung der Mäuse in der Rückenlage wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba geöffnet. Die Hinterbeine wurden bis zum Hüftgelenk freipräpariert und entnommen. Ober- und Unterschenkelknochen wurden am Kniegelenk getrennt und an den Gelenkenden geöffnet. Danach wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 2 ml-Einmalspritze und aufgesetzter Einmalinjektionskanüle mit Medium I aus den Knochen gespült. Das Knochenmark wurde in ein Zellsieb gegeben und durch Verwendung des Spritzenstempels zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 10 °C, 200 x g) erfolgte die Wiederaufnahme des Zellpellets in 1 ml Medium I. Aus dieser Zellsuspension wurden nun mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation murine neutrophile Granulozyten gewonnen. Hierfür wurden 12 ml 65 %ige Percolllösung in ein Polypropylenröhrchen vorgelegt und mit 10 ml 75 %iger Percolllösung unterschichtet. Es wurde die aus dem Knochenmark gewonnene Zellsuspension auf den zweistufigen Percollgradienten pipettiert. Die anschließende Zentrifugation (35 min, 10 °C, 500 x g) trennte die murinen neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten von den murinen mononukleären Zellen (Abbildung 4). Hierbei reicherten sich die murinen neutrophilen Granulozyten an der Interphase zwischen 65 %igem und 75 %igem Percoll an. Die mononukleären Zellen sammelten sich auf der 65 %igen Percollschicht. Am Boden des Zentrifugenröhrchens befand sich die Erythrozytenphase. Die mononukleären Zellen wurden verworfen. Nur die granulozytenreiche Phase wurde vorsichtig abgenommen und zweimal mit jeweils 15 ml Medium I gewaschen (10 min, 10 °C, 200 x g). Daran schloss sich die Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit 1 ml *aqua dest.* für 30 s an. Die Zugabe von 1 ml 1,8 %iger NaCl-Lösung stoppte die Reaktion. Nach einem erneuten Waschschrift mit Medium I wurden die Zellzahl und die Vitalität der Zellen mit Hilfe eines Hämatocytometers (Neubauer Kammer) bestimmt. Die Reinheit der erhaltenen Population wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.



**Abbildung 4: Gewinnung und Anreicherung neutrophiler Granulozyten aus murinem Knochenmark durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation.** Auf einen zweiseitigen Percollgradienten wurden in Medium I resuspendierte murine Knochenmarksvorläuferzellen geschichtet. Die Zentrifugation (10 min, 10 °C, 500 x g) trennte die Zellen in Abhängigkeit ihrer spezifischen Dichte auf.

#### 4.1.2 Bestimmung der Reinheit und Vitalität der murinen neutrophilen Granulozyten

Um die gewonnenen murinen neutrophilen Granulozyten für die jeweiligen Versuche in der benötigten Zelldichte (Zellen/ml) einzusetzen, wurden die Zellzahl und die Vitalität mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen 1:10 mit Trypanblau (4 % m/v) verdünnt und mikroskopisch ausgezählt. Um weiterhin eine ausreichend hohe Reinheit an murinen neutrophilen Granulozyten sicherzustellen, wurden die isolierten Zellen durchflusszytometrisch auf das granulozytenspezifische Oberflächenglykoprotein Gr-1 untersucht. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l Medium I resuspendiert und mit einem FITC-gekoppelten anti-Gr-1 Antikörper bei 4 °C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 10 ml Medium I (10 min, 10 °C, 200 x g,) wurde das Zellpellet in 500  $\mu$ l Medium I aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Für die geplanten Experimente wurden ausschließlich Zellpopulationen, die zu mehr als 80 % aus murinen neutrophilen Granulozyten bestanden, verwendet.

#### 4.1.3 Durchflusszytometrie

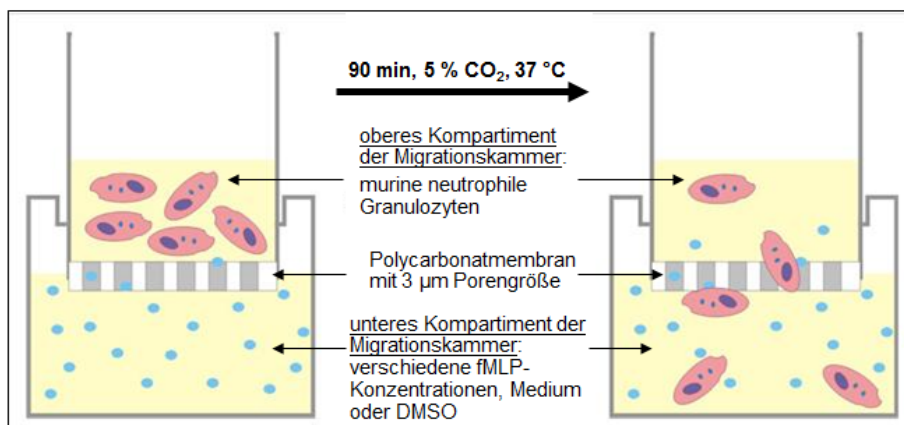
Das im Rahmen dieser Arbeit genutzte Durchflusszytometer, das FACScan, konnte gleichzeitig die relative Zellgröße mittels *Forward Scatter* (FSC), die Granularität mittels

*Side Scatter* (SSC) sowie bis zu drei emittierte Wellenlängen messen. Es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das Wellenlängen bei 520 nm emittiert, sowie Phycoerythrin (PE), dessen Emissionsmaximum bei 585 nm und 575 nm liegt, verwendet. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale wurden durch verschiedene Photomultiplier detektiert und die resultierenden Signale durch die Cell-Quest-Pro-Software 4.0.2. verarbeitet und ausgewertet.

Mittels Durchflusszytometrie wurden in der vorliegenden Arbeit die Reinheit der isolierten Zellpopulation, die Lokalisierung der fMLP-Rezeptoren und des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche, sowie das Migrationsverhalten und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts (F-Aktin) untersucht.

#### **4.1.4 In vitro-Migration**

Mit dem Migrationstest, der auf einer modifizierten Boyden-Kammer-Technik beruht (Boyden 1962, Martinet et al. 1994), wurde fMLP-stimuliertes migratorisches Verhalten muriner neutrophiler Granulozyten *in vitro* untersucht. Hierbei befanden sich im oberen Kompartiment der Migrationskammer die murinen neutrophilen Granulozyten. Im unteren Kompartiment befanden sich verschiedene fMLP-Konzentrationen, Medium oder die Negativkontrolle DMSO (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung zur Untersuchung der Migration muriner neutrophiler Granulozyten *in vitro* (abgeändert nach [http://www.chemie.tu-darmstadt.de/schmitz/forschung\\_7/interaktionsstudien](http://www.chemie.tu-darmstadt.de/schmitz/forschung_7/interaktionsstudien)). Die murinen neutrophilen Granulozyten migrierten aktiv aus dem oberen Kompartiment über die poröse Polycarbonatmembran in das untere Kompartiment der Migrationskammer. Im unteren Kompartiment befanden sich verschiedene fMLP-Konzentrationen, Medium oder die Negativkontrolle DMSO.

Für die Versuche wurden pro Ansatz  $5 \times 10^5$  Zellen in 65  $\mu\text{l}$  Reaktionsmedium in das obere Kompartiment der Migrationskammer gegeben. Im darunter liegenden Kompartiment befanden sich jeweils 150  $\mu\text{l}$  Medium oder verschiedene fMLP- bzw. DMSO-Konzentrationen im Bereich von 0,02  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$ . Die Zellen migrierten über die Polycarbonatmembran, die mit Poren des Durchmessers der Größe 3  $\mu\text{m}$  durchsetzt war, in das untere Kompartiment über einen Zeitraum von 90 min bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ . Die jeweiligen Ansätze wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurde der Inhalt der unteren Kompartimente in entsprechend beschriftete Polypropylenröhrchen pipettiert. Nicht migrierte Zellen im oberen Kompartiment wurden verworfen. Die an der Unterseite der Polycarbonatmembran adhärirten Zellen wurden durch die Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Trypsin-EDTA (10 min, 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) abgelöst. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die auf diese Weise erhaltenen Zellen wurden entsprechend den zuvor beschrifteten Polypropylenröhrchen zugegeben. Die erhaltenen Proben wurden zentrifugiert (10 min, 10 °C, 200 x g) und das erhaltene Pellet in 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsmedium resuspendiert. Es folgte die quantitative Bestimmung der Zellen in den Proben mittels Durchflusszytometrie. Es wurde hierfür die Anzahl der Zellen, die bei der schnellsten Einstellung des Durchflusses (hi flow = 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) über einen Zeitraum von 60 s den Laserstrahl passieren, ermittelt. Aus den erhaltenen Zellzahlen der Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte gebildet. Mit diesen Mittelwerten wurde der chemotaktische Index (CI) ermittelt, der eine Aussage über die migratorische Aktivität in den einzelnen Versuchsansätzen ermöglichte:

$\text{CI} = \frac{\text{Mittelwert der Anzahl migrierter Zellen in Anwesenheit von fMLP}}{\text{Mittelwert der Anzahl migrierter Zellen zur Mediumkontrolle}}$

Mittelwert der Anzahl migrierter Zellen zur Mediumkontrolle

Zur Veranschaulichung der Daten und für eine bessere Vergleichbarkeit wurde die Anzahl der migrierten WT-Zellen zur Mediumkontrolle eins gesetzt. Alle erhaltenen Werte wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

#### **4.1.5 Messung des filamentösen Aktins (F-Aktin)**

Ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts muriner neutrophiler Granulozyten ist filamentöses Aktin (F-Aktin). Howard und Meyer entwickelten eine Methode, die es ermöglicht, mit Hilfe von NBD-Phalloidin den F-Aktin Gehalt der Zellen zu messen (Howard und Meyer 1984). Für die Messung des relativen Gehaltes an F-Aktin wurden  $3 \times 10^5$  murine neutrophile Granulozyten in 500  $\mu$ l Medium I gegeben und 5 min bei 37 °C und 550 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Unterdessen wurden je 50  $\mu$ l Formaldehyd (3,7 %) in entsprechend beschriftete Polypropylenröhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden mit verschiedenen fMLP- bzw. DMSO-Konzentrationen im Bereich von 0,02  $\mu$ M bis 20  $\mu$ M aktiviert oder blieben unstimuliert. DMSO diente als Negativkontrolle. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden je 50  $\mu$ l der Zellen in die mit Formaldehyd vorbereiteten Polypropylenröhrchen gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurden jedem Ansatz 50  $\mu$ l NBD-Puffer zugegeben. Bevor die Messung am FACScan erfolgte, wurden die Proben für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Von 30.000 Zellen wurde im linearen FL 1 Kanal die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt. Der relative Gehalt an F-Aktin der Zellen wurde aus dem Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von fMLP-stimulierten zu unstimulierten Zellen ermittelt. Der relative F-Aktin Gehalt unstimulierter WT-Zellen erhielt den Wert eins und alle weiteren Werte wurden zu diesem ins Verhältnis gesetzt. Um zu prüfen, ob es sich bei dem erhaltenen Fluoreszenzsignal um F-Aktin handelt, wurden die Zellen mit Cytochalasin B inkubiert. Cytochalasin B ist ein Pilzmetabolit, der die Verlängerung der Aktinfilamente inhibiert. Die Zellen wurden hierfür vor fMLP-Zugabe 20 min bei 37 °C und 550 rpm auf dem Thermomixer mit 10  $\mu$ M Cytochalasin B inkubiert.

#### **4.1.6 Adhäsionsassay**

Die Fähigkeit muriner neutrophiler Granulozyten an Fibrinogen zu binden, wurde im Adhäsionsassay untersucht. Hierfür wurden 96-Loch Mikrotiterplatten EIA/RIA über Nacht bei 4 °C mit jeweils 100  $\mu$ l Fibrinogen (20  $\mu$ g/ml) oder der Negativkontrolle BSA

(1 mg/ml) beschichtet. Ungebundenes Fibrinogen bzw. BSA wurde durch zweimaliges Waschen mit HBSS entfernt und die Mikrotiterplatte mit Blocking-Puffer (200 µl/Probenloch) für 60 min bei 37 °C abgesättigt. Nach erneutem Waschen der beschichteten Mikrotiterplatte mit HBSS wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 50 µl Medium II je Probenloch eingesetzt. Die Zellen blieben unstimuliert oder wurden mit 2 µM fMLP stimuliert. Die Adhäsion erfolgte über einen Zeitraum von 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die jeweiligen Ansätze wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mehrmals mit HBSS gewaschen, um nichtadhärente Zellen zu entfernen. Die Bestimmung adhärenter Zellen erfolgte modifiziert nach einer bereits beschriebenen Methode (Kueng et al. 1989). Die Zellen wurden hierzu mit 3,7 %igem Formaldehyd (100 µl/ Probenloch) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrift mit HBSS wurden die Zellen für 20 min mit Kristallviolett-Lösung bei Raumtemperatur angefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde gründlich mit *aqua bidest.* herausgewaschen. Nach dem Trocknen der gefärbten Zellen wurden sie durch eine 30-minütige Inkubation mit 100 µl SDS-Lösung je Probenloch bei Raumtemperatur lysiert. Die Absorption wurde bei 595 nm im ELISA-Reader ermittelt. Aus den Doppelbestimmungen der jeweiligen Ansätze wurden die Mittelwerte gebildet. Aus den Mittelwerten errechnete sich die spezifische Adhäsion der Zellen an Fibrinogen wie folgt:

$$\text{spezifische Bindung an Fibrinogen} = \text{OD}_{595} \text{ Fibrinogen} - \text{OD}_{595} \text{ BSA}$$

Zur Veranschaulichung der Daten und für eine bessere Vergleichbarkeit erhielt die Adhäsion unstimulierter WT-Zellen an Fibrinogen den Wert eins und alle erhaltenen Werte wurden zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

#### **4.1.7 Analyse der fMLP-Rezeptoren sowie des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche**

Die Analyse der fMLP-Rezeptoren sowie des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche muriner neutrophiler Granulozyten erfolgte mittels fluorochrommarkierter Antikörper im FACScan. Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^6$  isolierte Zellen in 100 µl Medium I gegeben und 5 min bei 37 °C und 550 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Die

Bestimmung der fMLP-Rezeptoren erfolgte im unstimulierten Zustand der Zellen. Die Lokalisierung des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche wurde im unstimulierten Zustand und nach Stimulierung mit jeweils 2  $\mu\text{M}$  fMLP oder DMSO als Negativkontrolle über einen Zeitraum von 50 min untersucht. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen in FACS-Röhrchen gegeben, in denen sich 100  $\mu\text{l}$  eiskaltes Medium I befand. Die Proben wurden mit den entsprechenden fluorochrommarkierten Antikörpern bzw. den Antikörpern der IgG-Subtypen (Isotypkontrollen) für 30 min bei 4  $^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Zwei anschließende Waschschrte (10 min, 10  $^{\circ}\text{C}$ , 200 x g) mit je 300  $\mu\text{l}$  Medium I entfernten ungebundene Antikörper in den jeweiligen Proben. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  Medium I resuspendiert und durchflusszytometrisch auf die fMLP-Rezeptoren sowie CD11b auf der Zelloberfläche analysiert. Parallel dazu wurde eine ungefärbte Probe mitgeführt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu bestimmen.

Mit Hilfe des Programms Cell-Quest-Pro 4.0.2. wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 50.000 Zellen ermittelt. Durch die Histogrammarker wurde das unspezifische Fluoreszenzsignal des IgG-Subtypes vom spezifischen Fluoreszenzsignal (MFI) des Adhäsionsmoleküls CD11b abgegrenzt. Das Verhältnis der spezifischen MFI von CD11b nach fMLP-Stimulierung zur spezifischen MFI von CD11b unstimulierter Zellen zeigte den zeitlichen Verlauf der Lokalisierung des Adhäsionsmoleküls auf der Zelloberfläche. Zur Veranschaulichung der Daten und für eine bessere Vergleichbarkeit wurde die spezifische MFI von CD11b unstimulierter WT-Zellen eins gesetzt. Alle erhaltenen Werte wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

#### **4.1.8 Bestimmung des reaktiven Sauerstoffmetaboliten $\bullet\text{O}_2^-$**

Die intra- und extrazellulär gebildeten Superoxidanionen ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) wurden anhand der Chemilumineszenz von Lucigenin ermittelt (Li et al. 1998, Franck et al. 2009). Es wurden pro Ansatz  $2 \times 10^6$  Zellen in 180  $\mu\text{l}$  Medium I aufgenommen und mit 200 nM Lucigenin versetzt. Im Falle der Vorstimulierung wurden den Zellen LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und murines TNF $\alpha$  (10 ng/ml) zugegeben. Anschließend wurden die Proben in vorgewärmte Opti Plates<sup>TM</sup> gegeben und 30 min bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Unmittelbar nach der Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  fMLP bzw. der Negativkontrolle DMSO erfolgte die Messung der  $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion als

Doppelbestimmung über einen Zeitraum von 120 s im Luminometer LB 96V. Aus den Doppelbestimmungen der Ansätze wurden die Mittelwerte gebildet. Die Ergebnisse wurden als relative Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) angegeben.

## **4.2 Proteinanalytische Methoden**

### **4.2.1 Aktivierung und Lyse muriner neutrophiler Granulozyten**

Um die Aktivierung von Signalmolekülen muriner neutrophiler Granulozyten zu analysieren, wurden phosphospezifische Antikörper eingesetzt. Es wurden pro Ansatz  $2 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium I gegeben und 5 min bei 37 °C und 550 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden sie über einen Zeitraum von 600 s mit fMLP bzw. der Negativkontrolle DMSO (jeweils 2 µM) stimuliert. Im Falle der Untersuchung der CD11b-Proteinmenge wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen für 15 min mit 2 µM fMLP stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Reaktion wurde durch kurzes Zentrifugieren gestoppt (4 °C, 10.000 x g) und der Überstand verworfen. Die Zugabe von 15 µl Lysispuffer zum Zellpellet und die zehnminütige Inkubation auf Eis bewirkten den Zellaufschluss. Dieser erfolgte in Gegenwart des nicht-ionischen Detergenz NP-40 sowie von Protease- und Phosphataseinhibitoren. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile mittels Zentrifugation (15 min, 4 °C, 10.000 x g) wurde das Proteinlysate in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 5-fach Probenauftragspuffer versetzt. Die anschließende Denaturierung der Proteine erfolgte bei 95 °C für 5 min. Die so erhaltenen Proteingemische wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

### **4.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE basiert auf dem diskontinuierlichen Laemmli-System (1970) mit Tris-Glycin-Puffern (Laemmli 1970). Sie bietet die Möglichkeit Proteingemische entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufzutrennen. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 10 %ige und 15 %ige SDS-



Polyacrylamid-Gele hergestellt (siehe 3.8). Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte in einem vertikalen Minigelsystem bei konstanter Stromstärke von 45 mA pro Gel.

#### **4.2.3 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen**

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden sie auf eine PVDF-Membran transferiert und immobilisiert (Gershoni und Palade 1983). Die PVDF-Membran wurde dafür zunächst 1 min in Methanol äquilibriert. Die aufgetrennten Proteine des Gels wurden anschließend mit Hilfe eines Tank-Blot-Systems für 90 min bei einer konstanten Spannung von 50 Volt auf die PVDF-Membran transferiert. Unspezifische freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in NET-G-Puffer geblockt. Die Inkubation des Primärantikörpers (in NET-G-Puffer verdünnt) erfolgte bei 4 °C und mäßiger Bewegung über Nacht. Die PVDF-Membran wurde anschließend dreimal für jeweils 10 min mit NET-G-Puffer gewaschen bevor der Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit NET-G-Puffer, wurde sie mit dem ECL-Western-Blotting-Substrat benetzt. Die ablaufende peroxidasevermittelte Chemilumineszenzreaktion wurde mit Hilfe des MF-ChemiBIS 3.2-Gerätes detektiert und entstandene Signale wurden mittels der TotalLab-Software quantifiziert. Das Verhältnis aus phosphorylierter zu unphosphorylierter Form des Proteins diente als Maß für die Aktivierung. Zur Veranschaulichung der Daten und für eine bessere Vergleichbarkeit erhielt der Aktivierungsstatus der Proteine in unstimulierten WT-Zellen den Wert eins. Alle erhaltenen Werte wurden zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

#### **4.2.4 Stripping von PVDF-Membranen**

Mehrfach war es erforderlich verschiedene Proteine auf einer PVDF-Membran nachzuweisen. Deshalb wurden die Antikörper nach der Detektion von der Membran entfernt. Die Membran wurde hierzu für 30 min unter leichtem Schwenken bei 55 °C mit 10 ml *Stripping*-Puffer inkubiert. Nach drei Waschgängen in NET-G-Puffer für je 10 min

wurde die Membran erneut für eine Stunde in NET-G-Puffer geblockt. Im Anschluss daran wurden die entsprechenden Primär - und Sekundärantikörper zugegeben.

#### **4.2.5 Pulldown-Experimente**

Der Anteil aktiver, GTP-gebundener Rac-GTPase in den Zellen wurde durch *Pulldown*-Experimente ermittelt. Hierfür wurden jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Reaktionsmedium resuspendiert und über einen Zeitraum von 30 s mit 2  $\mu\text{M}$  fMLP aktiviert. Die größtmögliche GTP-Beladung der Rac-GTPase wurde durch GTP $\gamma$ S (100  $\mu\text{M}$ ) erreicht (Positivkontrolle). Die Aktivierung der Zellen wurde durch kurzes Zentrifugieren (4 °C, 10.000 x g) gestoppt und der Überstand verworfen. Die Zugabe von 1 ml eiskaltem *Pulldown*-Lysispuffer zum Zellpellet bewirkte den Zellaufschluß. Der Lysispuffer enthielt neben den Protease- und Phosphataseinhibitoren auch PAK1B-CRIB<sup>GST</sup>. PAK1B-CRIB<sup>GST</sup> interagiert ausschließlich mit GTP-gebundenem Rac. Durch die anschließende Zentrifugation (15 min, 4 °C, 10.000 x g) wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt. Das Proteinlysate wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 40  $\mu\text{l}$  Glutathione ChroMatrix, die zuvor mehrfach mit Lysispuffer gewaschen wurde, versetzt. Durch die nachfolgende 30-minütige Inkubation auf einem Rotator (4 °C, 11 rpm) interagierten PAK1B -CRIB<sup>GST</sup>/Rac-GTP und die Glutathione ChroMatrix. Die anschließende kurze Zentrifugation bei 4 °C präzipitierte den Komplex. Für die Bestimmung von Rac-GDP, das im Überstand verblieb, wurden 40  $\mu\text{l}$  des Überstandes abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5-fach Probenauftragspuffer versetzt. Der restliche Überstand wurde verworfen und der präzipitierte Komplex aus Rac-GTP und Glutathione ChroMatrix wurde mehrmals mit 250  $\mu\text{l}$  Lysispuffer gewaschen bevor 40  $\mu\text{l}$  5-fach Probenauftragspuffer zugegeben wurden. Die erhaltenen Proben wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert, bevor sie über eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

Die Detektion der Rac-GTPasen erfolgte mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Der Anteil aktivierter Rac-GTPase in den einzelnen Versuchsansätzen wurde durch das Verhältnis von Rac-GTP zu Rac-GDP ermittelt. Es wurde zur Veranschaulichung der Daten und für eine bessere Vergleichbarkeit der Anteil aktivierter Rac-GTPase in den

unstimulierten WT-Zellen eins gesetzt. Alle erhaltenen Werte wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt.

### **4.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.3.1 RNA-Isolierung und Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA**

Die Isolierung der Gesamt-RNA unstimulierter und fMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit. Die Stimulierung der Zellen mit 2  $\mu$ M fMLP erfolgte über einen Zeitraum von 15 min. Es wurden maximal  $10 \times 10^6$  unstimulierte bzw. fMLP-stimulierte Zellen mit 1-fach HBSS gewaschen und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 600  $\mu$ l Lysispuffer versetzt. Das Lysat wurde durch 2 minütiges Zentrifugieren bei 20.000 x g und Raumtemperatur in den QIAshredder Spinsäulen homogenisiert. Dem Lysat wurden anschließend 600  $\mu$ l 70 %iges Ethanol zugegeben bevor es auf eine RNeasy Mini-Säule pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert wurde. Die Gesamt-RNA war an die Membran der Mini-Säule gebunden, während die übrigen Substanzen ausgewaschen wurden. Im nächsten Schritt wurden 700  $\mu$ l RW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Vor dem Eluieren der Gesamt-RNA wurden 500  $\mu$ l RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und erneut bei Raumtemperatur für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Schließlich wurde die Gesamt-RNA durch die Zugabe von 50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert (1 min bei 8.000 x g und Raumtemperatur). Die isolierte Gesamt-RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA-Proben erfolgte durch eine spektrophotometrische Messung mittels Nanodrop-1000. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  und  $OD_{260}/OD_{230}$  gab Aufschluss über die Reinheit der RNA. Dabei entsprach ein Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  von 1.9 bis 2.0 und ein Quotient  $OD_{260}/OD_{230}$  von 2.0 bis 2.1 reiner RNA.

### **4.3.2 Reverse Transkription**

Bei der reversen Transkription diente die isolierte einzelsträngige RNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA). Mit Hilfe des RNA-to-cDNA Kits wurden maximal 2 µg Gesamt-RNA pro 20 µl Reaktionsansatz in cDNA transkribiert (Tabelle 4). Im Mastercycler wurde die RNA für 60 min bei 37 °C in cDNA umgeschrieben und die enzymatische Reaktion bei 95 °C für 5 min gestoppt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert und für die quantitative Real-Time (RT)-PCR verwendet.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Transkription der RNA in cDNA.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Reaktionsansatz</b>
2x RT-Puffer	10 µl
20x RT-Enzym-Mix	1.0 µl
RNA-Probe	bis zu 9 µl
Nuclease-freies Wasser	auf 20 µl auffüllen (bei Bedarf)

### **4.3.3 Quantitative Real-Time (RT)-PCR**

Zur Untersuchung der Expression des CD11b-Genes wurde die quantitative RT-PCR mit TaqMan Sonden durchgeführt. Die TaqMan Sonden waren am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher *minor groove binder* (MGB) gekoppelt. Der RT-PCR Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 50 ng cDNA und die in Tabelle 5 aufgeführten Komponenten. Jeder Reaktionsansatz wurde als 4-fach Bestimmung durchgeführt. Im Falle der Negativkontrolle wurde dem Reaktionsansatz anstatt der cDNA, RNase-freies Wasser zugegeben. Als Referenzgen wurde die murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die WT-neutrophilen Granulozyten dienten als Kalibrator.

**Tabelle 5: Komponenten eines quantitativen RT-PCR Reaktionsansatzes.**

Reaktionskomponente	Volumen/Ansatz (50 µl Reaktionsvolumen)
TaqMan Universal PCR Master Mix	25 µl
20X TaqMan Gene Expression	2,5 µl
cDNA in RNase-freiem Wasser gelöst	22,5
Gesamtvolumen	50 µl

Die quantitative RT-PCR wurde am ABI 7500 System mit dem in Tabelle 6 aufgeführten Programm durchgeführt.

**Tabelle 6: Quantitative RT-PCR Bedingungen mit Dauer und Anzahl der Zyklen sowie der Probentemperatur.**

RT-PCR Schritt	Zyklenzahl	Zyklendauer	Temperatur
1	1	2 min	50 °C
2	1	10 min	95 °C
3	40	15 s 1 min	95 °C 60 °C

Der Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) wurde mit Hilfe der SDS v1.3 Software ermittelt. Die relative Quantifizierung der CD11b-Genexpression erfolgte mit Hilfe der vergleichenden  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ergab sich hierbei aus der Änderung der CD11b-Genexpression normalisiert auf das Referenzgen GAPDH und relativ zum Kalibrator (WT-Zellen). Der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert wurde anschließend in die Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  eingesetzt, was der relativen Quantifizierung (RQ-Wert) entsprach.

$$\Delta\text{Ct}_{\text{WT}} = \text{Ct}_{\text{CD11b (WT)}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH (WT)}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Swap-70}^{-/-}} = \text{Ct}_{\text{CD11b (Swap-70}^{-/-})} - \text{Ct}_{\text{GAPDH (Swap-70}^{-/-})}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Swap-70}^{-/-}} - \Delta\text{Ct}_{\text{WT}}$$

$$\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

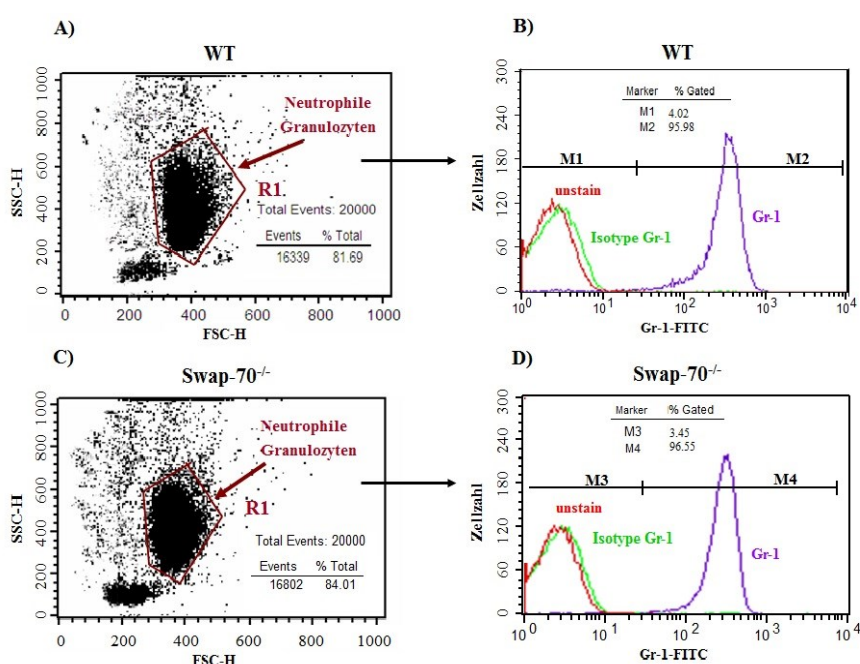
#### **4.4 Statistische Auswertung und Darstellung**

Zur Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen der Versuchsgruppen wurde der ungepaarte zweiseitige T-Test mit Hilfe der Statistik-Software GraphPad Prism 3.0 durchgeführt. Als statistisch signifikant galt, wenn  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$ (\*\*\*). Alle Werte  $p > 0,05$  galten als statistisch nicht signifikant (ns). In der vorliegenden Arbeit wurde das arithmetische Mittel der jeweiligen Gruppe mit dem Mittelwert des Standardfehlers (SEM) als Fehlerbalken dargestellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analyse der Reinheit der isolierten murinen neutrophilen Granulozyten

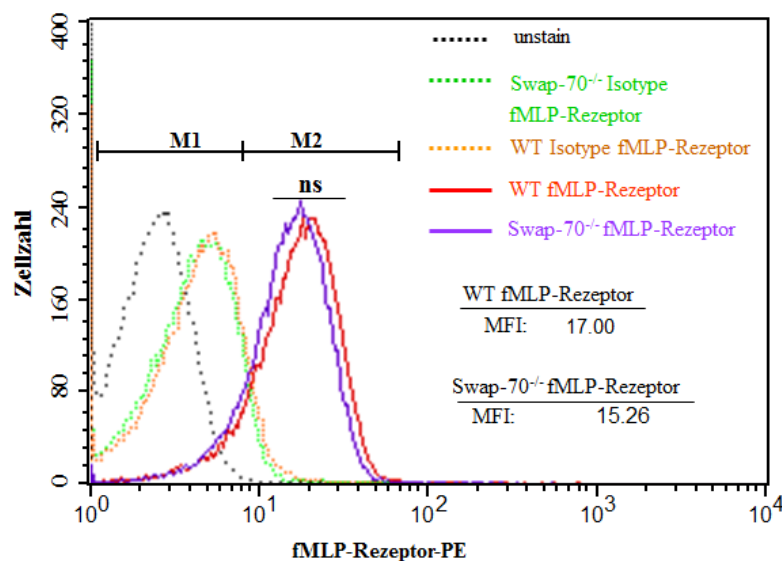
Die Reinheit der gewonnenen Zellen wurde durchflusszytometrisch zum einen anhand des Rezeptorstatus von Gr-1 und zum anderen anhand der Morphologie bestimmt. Morphologisch weisen neutrophile Granulozyten gegenüber anderen mononukleären Zellen eine größere Zelloberfläche und stärkere Granularität auf. Zeigten mehr als 80 % der isolierten Zellen diese phänotypischen Eigenschaften, wurden die Populationen durch die *Region of interest 1* (R1) gekennzeichnet und auf Gr-1 untersucht (Abbildung 6A bis 6D). Gr-1 ist ein granulozytenspezifischer Oberflächenmarker. Die WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Populationen zeigten ähnliche Fluoreszenzintensitäten für Gr-1, die sich nicht signifikant unterschieden (Abbildung 6B und 6D). Demnach wiesen die durch R1 markierten Populationen eine annähernd identische Anzahl von Gr-1 auf der Zelloberfläche auf und bestanden zu rund 95 % aus neutrophilen Granulozyten.



**Abbildung 6: Analyse der Reinheit der gewonnenen neutrophilen Granulozyten von Swap-70<sup>-/-</sup> und WT-Mäusen mittels Durchflusszytometrie. A und C) Aufgrund der Zellgröße und Granularität wurden murine neutrophile Granulozyten durch die *Region of interest 1* (R1) abgegrenzt. B und D) Die Zugabe des FITC-gekoppelten anti-Gr-1 Antikörpers zeigte den Anteil muriner neutrophiler Granulozyten innerhalb von R1. Durch die Histogrammmarker M1 und M3 wurde hierbei das unspezifische Fluoreszenzsignal des IgG-Isotypes vom spezifischen Fluoreszenzsignal für Gr-1 (M2 und M4) abgegrenzt. Die Reinheit der Zellen wurde vor jedem Experiment überprüft.**

Die in der Arbeit untersuchten Antworten muriner neutrophiler Granulozyten wurden durch das bakterielle Tripeptid fMLP ausgelöst, das an die Rezeptoren FPR1 und FPR2/ALX bindet (Panaro et al. 2006, Ye et al. 2009). Um die fMLP-vermittelte Signaltransduktion in den WT- und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst die Rezeptormenge auf der Zelloberfläche unstimulierter Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Der hierfür verwendete PE-gekoppelte Antikörper erkannte sowohl die FPR1- als auch die FPR2/ALX-Rezeptoren.

Abbildung 7 zeigt, dass sich die Fluoreszenzintensitäten der fMLP-Rezeptoren zwischen den WT- und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen nicht signifikant unterscheiden. Das bedeutet, dass die Zellen im Ruhezustand eine annähernd identische Anzahl an fMLP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufwiesen. Folglich sind Unterschiede in den untersuchten zellulären Antworten muriner neutrophiler Granulozyten nicht auf eine grundsätzlich veränderte Rezeptormenge auf der Zelloberfläche zurückzuführen.



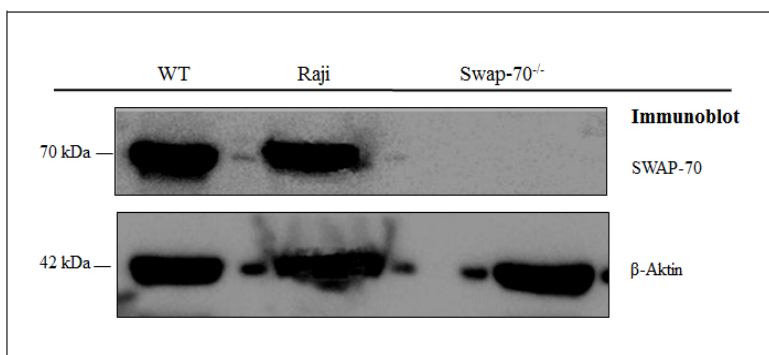
**Abbildung 7: Untersuchung der fMLP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche primärer unstimulierter neutrophiler Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels Durchflusszytometrie.** Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^6$  unstimulierte Zellen mit einem PE-gekoppelten Antikörper, der die Rezeptoren FPR1 und FPR2/ALX erkennt, sowie dem IgG-Isotyp inkubiert. Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde durch eine ungefärbte Probe ermittelt. Durch den Histogrammmarker M1 wurde das unspezifische Fluoreszenzsignal des IgG-Isotypes vom spezifischen Fluoreszenzsignal der fMLP-Rezeptoren (M2) abgegrenzt. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) eines repräsentativen Experimentes von insgesamt 3 unabhängig durchgeführten Experimenten und  $p > 0,05$  (ns).



## **5.2 Murine neutrophile Granulozyten synthetisieren SWAP-70**

Murine Immunzellen, wie Mastzellen, dendritische Zellen, eosinophile Granulozyten und B-Zellen, synthetisieren das Protein SWAP-70 (Borggreve et al. 1999, Gross et al. 2002, Oberbanscheidt et al. 2006, Bahaie et al. 2012). Mittels Western Blot wurde die Existenz von SWAP-70 in murinen neutrophilen Granulozyten untersucht. Hierfür wurden Zelllysate von WT-Zellen, Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen sowie Raji-Zellen (Positivkontrolle) mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers auf SWAP-70 untersucht. Raji-Zellen sind eine humane B-Zelllinie des Burkitt-Lymphoms.

In den Lysaten der WT-Zellen und Raji-Zellen konnte SWAP-70 immunologisch detektiert werden (Abbildung 8). In den Lysaten der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen war dies hingegen nicht möglich (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Immunologische Analyse von SWAP-70 in neutrophilen Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>- Mäusen mittels Western Blot.** Es wurden die Lysate von jeweils  $2 \times 10^6$  WT-, Raji- (Positivkontrolle) und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Im Western Blot erfolgte daraufhin die Detektion von SWAP-70 mit einem polyklonalen Antikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

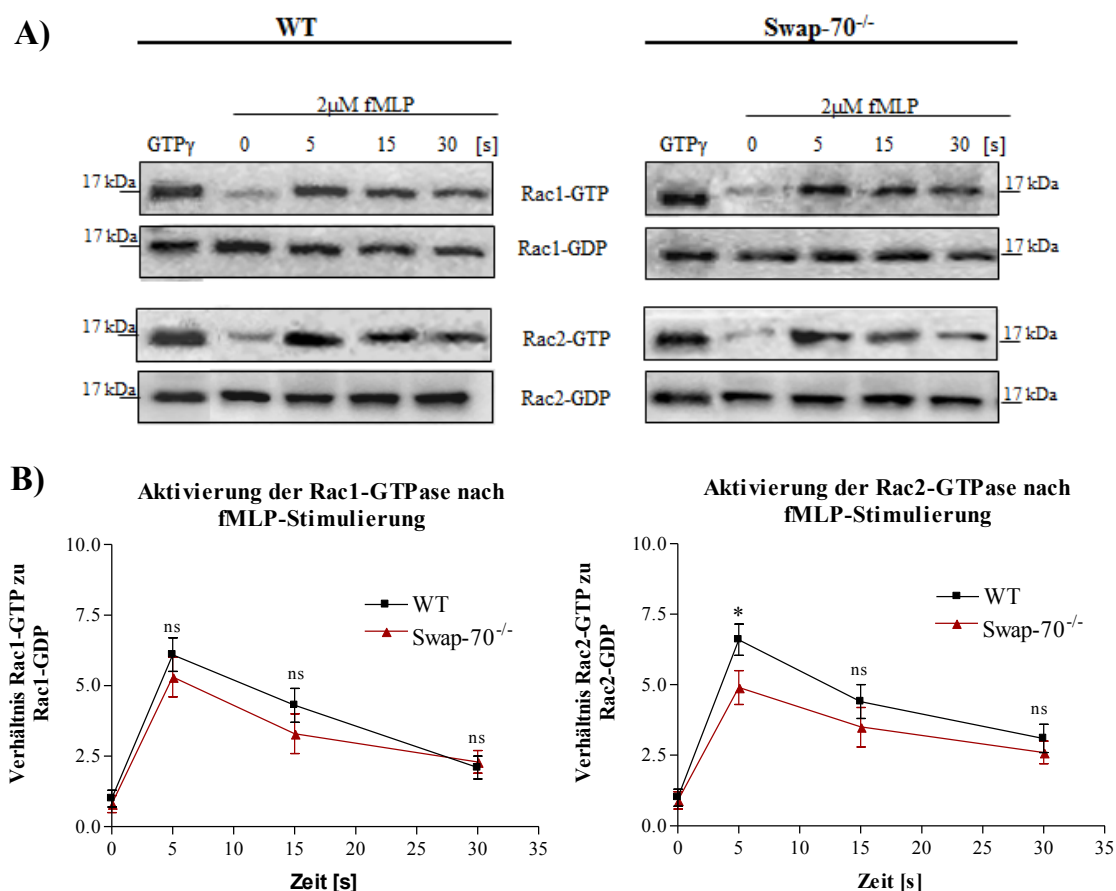
## **5.3 SWAP-70 beeinflusst die Aktivierung der Rac2-GTPase**

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass SWAP-70 in die Aktivierung einiger Rho-GTPasen, unter anderem der Rac-GTPase, involviert ist (Shinohara et al. 2002, Sivalenka und Jessberger 2004, Ocana-Morgner et al. 2009). Es wurde an dieser Stelle durch *Pulldown*-Experimente der Einfluss von SWAP-70 auf die Aktivierung der Rac-GTPasen in murinen neutrophilen Granulozyten untersucht. Da murine neutrophile Granulozyten die Isoformen Rac1 und Rac2 zu gleichen Teilen exprimieren (Li et al. 2002), wurde die

Aktivierung beider Isoformen analysiert. Hierfür blieben die Zellen unstimuliert oder wurden mit 2  $\mu$ M fMLP über einen Zeitraum von 30 s aktiviert und anschließend lysiert. Die maximal mögliche Rac-Aktivierung *in vitro* wurde durch GTP $\gamma$ S (Positivkontrolle) erreicht. Aus den Zellysaten wurde aktives Rac (Rac-GTP) präzipitiert und inaktives Rac (Rac-GDP) wurde aus dem Überstand entnommen. Die Proben wurden im Western Blot immunologisch auf Rac1 und Rac2 untersucht. Die Aktivierung der Rac1/2-GTPase in den einzelnen Versuchsansätzen wurde durch das Verhältnis von Rac1-GTP zu Rac1-GDP bzw. Rac2-GTP zu Rac2-GDP ermittelt.

Wie aus Abbildung 9A und 9B hervorgeht, induzierte die fMLP-Stimulierung in den WT-Zellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen eine transiente Aktivierung der Rac1- und der Rac2-GTPase mit Maximalwerten nach 5 s. Danach verringerte sich der Anteil an aktivierter Rac1- und Rac2-GTPase bis 30 s nach fMLP-Zugabe annähernd die Ausgangswerte erreicht wurden. Die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen zeigten gegenüber den WT-Zellen 5 s nach fMLP-Zugabe eine rund 30 % verringerte Aktivierung der Rac2-GTPase ( $p < 0,05$ ). Die Aktivierung der Rac1-GTPase unterschied sich zu diesem Zeitpunkt hingegen nicht signifikant. Weitere signifikante Unterschiede zwischen den WT- und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen waren über den untersuchten Zeitraum nicht erkennbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass SWAP-70 in fMLP-stimulierten murinen neutrophilen Granulozyten zwischen den Rac-Isoformen differenziert. Es beeinflusst vorrangig die Aktivierung der Rac2-GTPase.



**Abbildung 9: Aktivierung der Rac1- und der Rac2-GTPase in fMLP-stimulierten neutrophilen Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen.** **A)** Es wurden je  $4 \times 10^6$  WT-Zellen und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen mit der Positivkontrolle GTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) oder fMLP (2  $\mu$ M) über einen Zeitraum von 30 s stimuliert. Anschließend wurden sie lysiert und aktives Rac (Rac-GTP) wurde aus dem Zelllysat präzipitiert, während inaktives Rac (Rac-GDP) aus dem Überstand entnommen wurde. Die Proben wurden mittels polyklonaler Antikörper auf Rac1 und Rac2 im Western Blot untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Resultat von insgesamt 5 unabhängig durchgeführten Versuchen. **B)** Statistische Auswertung der Rac-Aktivierung mittels TotalLab-Software. Als Maß für die Aktivierung diente das Verhältnis von Rac-GTP zu Rac-GDP. Die Werte wurden auf die unstimulierten WT-Zellen (Wert eins) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 Versuchen mit signifikanten Werten  $p < 0,05$  (\*) und nicht signifikanten Werten  $p > 0,05$  (ns).

#### 5.4 SWAP-70 beeinflusst die ROS-Produktion

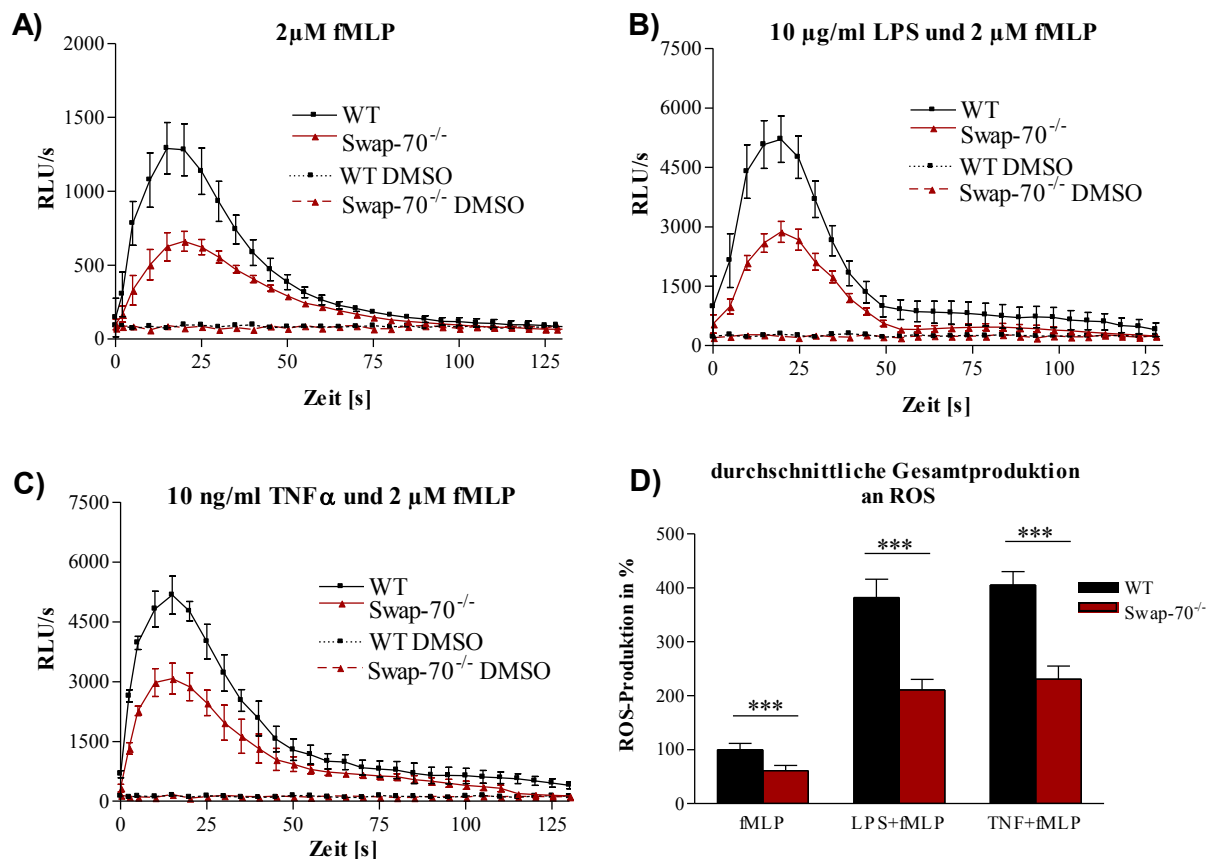
Die ROS-Produktion durch die NADPH-Oxidase ist ein charakteristisches Merkmal aktivierter neutrophiler Granulozyten (Knaus et al. 1991, Abo et al. 1991, Babior 1999, Dinauer 2003). Um den Einfluss von SWAP-70 auf die ROS-Produktion zu charakterisieren, wurden murine neutrophile Granulozyten in lucigeninhaltigem Medium resuspendiert.

Anschließend wurden sie mit 2  $\mu\text{M}$  fMLP in An- und Abwesenheit von LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert. LPS und TNF $\alpha$  sind selbst nicht in der Lage die ROS-Produktion auszulösen, erhöhen diese jedoch nach fMLP-Zugabe (Berkow und Dodson 1988, Vosbeck et al. 1990). Die ROS-Produktion wurde anhand der Chemilumineszenz von Lucigenin ermittelt. Die erhaltenen Signale wurden in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s) angegeben.

Wie aus Abbildung 10A zu entnehmen ist, wurde 10 s bis 15 s nach fMLP-Zugabe die größtmögliche ROS-Produktion in den WT-Zellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen erreicht. Danach verringerte sich die ROS-Produktion und 75 s nach fMLP-Zugabe erreichten beide Zellen die Ausgangswerte. Die größtmögliche ROS-Produktion der WT-Zellen lag bei 1310 RLU/s. Die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen wiesen hingegen eine etwa 2-fach verminderte ROS-Produktion von 625 RLU/s auf ( $p < 0,001$ ). Die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen zeigten im Vergleich zu den WT-Zellen über einen Zeitraum von 5 s bis 35 s nach fMLP-Zugabe eine signifikant verminderte ROS-Produktion.

Die Vorbehandlung der WT-Zellen mit LPS oder TNF $\alpha$  steigerte die maximale fMLP-induzierte ROS-Produktion verglichen mit der alleinigen fMLP-Stimulierung (1310 RLU/s) um das 4-fache (Abbildung 10B und 10C). Die größtmögliche ROS-Produktion lag demnach bei rund 5300 RLU/s und wurde 10 s bis 15 s nach fMLP-Zugabe erreicht. Ein ähnliches Verhalten zeigten LPS oder TNF $\alpha$  vorbehandelte Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen 10 s bis 15 s nach fMLP-Stimulierung. Die maximale ROS-Produktion erhöhte sich hierbei im Vergleich zur alleinigen fMLP-Stimulierung (625 RLU/s) um das 4,5-fache auf rund 3000 RLU/s (Abbildung 10B und 10C). Die maximale ROS-Produktion der LPS oder TNF $\alpha$  vorbehandelten Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen nach fMLP-Zugabe war im Vergleich zu den WT-Zellen somit um ca. 50 % vermindert (WT 5300 RLU/s, Swap-70<sup>-/-</sup> 3000 RLU/s,  $p < 0,001$ ). Der zeitliche Verlauf der ROS-Produktion war in den vorbehandelten WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen ähnlich und signifikante Unterschiede traten 5 s bis 35 s nach fMLP-Stimulierung auf.

Die Untersuchung der Gesamtmenge an ROS nach fMLP-Stimulierung in An- und Abwesenheit von LPS und TNF $\alpha$  zeigte in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen eine signifikant verminderte ROS-Produktion (Abbildung 10D). Die ROS-Produktion der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen nach alleiniger fMLP-Stimulierung war gegenüber den WT-Zellen um rund 48 % verringert. Im Falle der Vorbehandlung mit den Priming-Substanzen erreichten die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen nach fMLP-Stimulierung 55 % (LPS) bzw. 57 % (TNF $\alpha$ ) der ROS-Produktion der WT-Zellen.

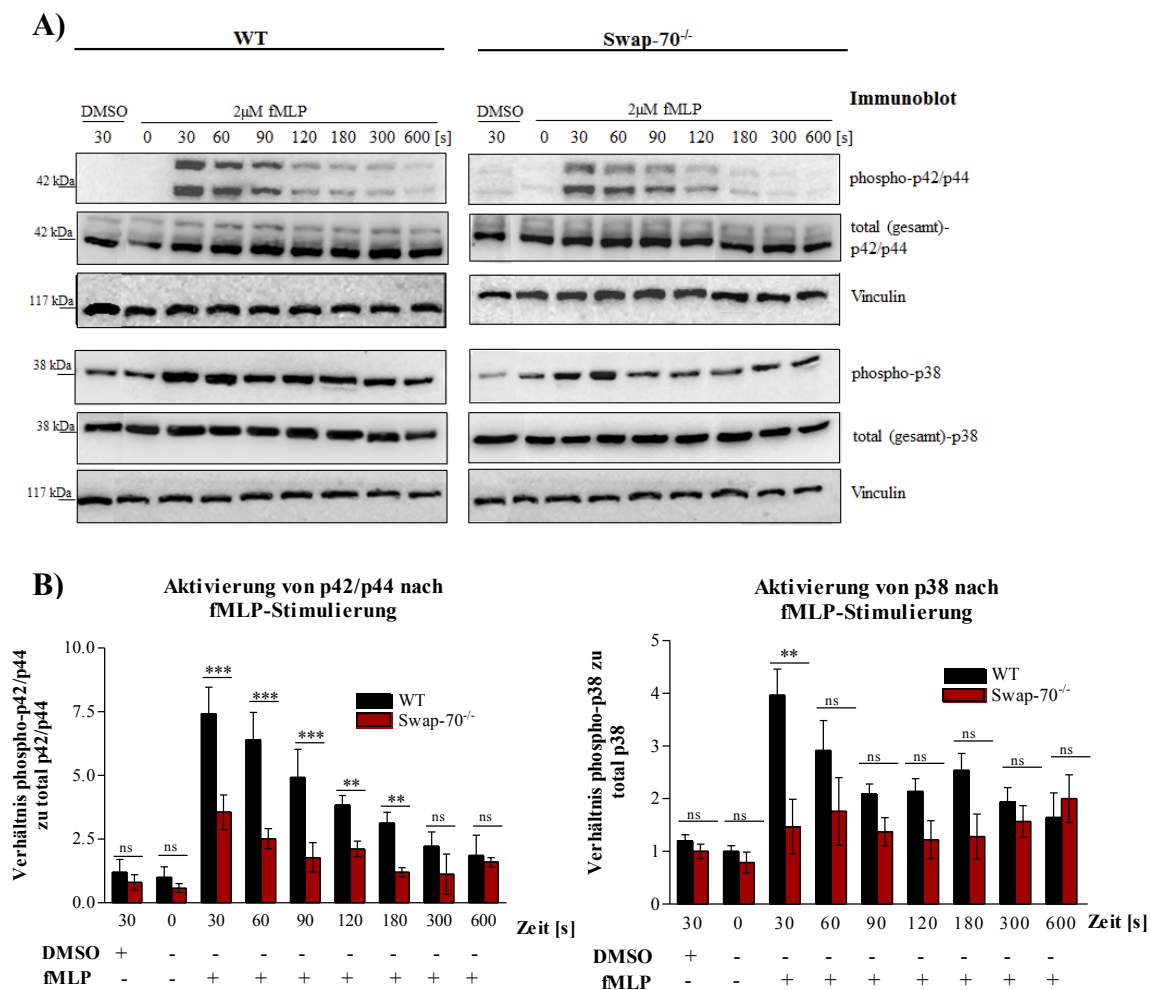


**Abbildung 10: ROS-Produktion fMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen in An- und Abwesenheit von LPS oder TNF $\alpha$ .** Es wurden je  $2 \times 10^6$  WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen in lucigeninhaltigem Medium für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Stimulierung der Zellen wurde die Bildung von  $\bullet\text{O}_2^-$  über einen Zeitraum von 120 s anhand der Chemilumineszenz von Lucigenin ermittelt. Als Negativkontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. **A)** ROS-Produktion nach Stimulierung mit 2 µM fMLP. **B)** Vorbehandlung der Zellen mit 10 µg/ml LPS und Induktion der ROS-Produktion durch 2 µM fMLP. **C)** Vorbehandlung der Zellen mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  und Auslösung der ROS-Produktion durch 2 µM fMLP. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus fünf unabhängigen Experimenten als RLU/s mit signifikanten Werten A) 5 s:  $p < 0,01$ ; 10 s bis 25 s:  $p < 0,001$ ; 30 s:  $p < 0,01$ ; 35 s:  $p < 0,05$ ; 40 s bis 120 s:  $p > 0,05$ ; B) 5 s bis 20 s:  $p < 0,001$ ; 25 s bis 35 s:  $p < 0,01$ ; 40 s bis 120 s:  $p > 0,05$ ; C) 5 s bis 30 s:  $p < 0,001$ ; 35 s:  $p < 0,01$ ; 40 s bis 120 s  $p > 0,05$ . **D)** Mit Hilfe des Integrals wurde die durchschnittlich produzierte Gesamtmenge an ROS über den Zeitraum von 120 s ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden zu den fMLP-stimulierten WT-Zellen (entsprechen 100 %) ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus fünf unabhängigen Experimenten mit signifikanten Werten  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### **5.5 SWAP-70 beeinflusst die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/p44, jedoch nicht die Aktivierung der Proteinkinasen AKT und GSK3 $\beta$**

Entscheidende Signalmoleküle in der fMLP-vermittelten Signalkaskade sind die PI3K $\gamma$ , die PI3K $\gamma$ -abhängige Proteinkinase B (AKT), die AKT-abhängige Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) sowie die MAP-Kinasen p38 und p42/p44 (Grinstein und Furuya 1992, Thompson et al. 1994, Kular et al. 1997, Zu et al. 1998, Hirsch et al. 2000). Mittels Western Blot wurde untersucht, ob SWAP-70 in murinen neutrophilen Granulozyten die Aktivierung von AKT und GSK3 $\beta$  sowie der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 2  $\mu$ M fMLP über einen Zeitraum von 600 s stimuliert. Anschließend wurden sie lysiert und das Gesamtzelllysate im 10 %igen SDS-PAA-Gel separiert. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und immunologisch auf die phosphorylierte und unphosphorylierte Form der MAP-Kinasen bzw. AKT und GSK3 $\beta$  untersucht. Der Anteil des aktivierten Proteins ergab sich aus dem Verhältnis der phosphorylierten zur unphosphorylierten Form. Die Negativkontrolle DMSO induzierte über den untersuchten Zeitraum (600 s) keine Phosphorylierung der untersuchten Signalmoleküle. Als repräsentatives Ergebnis wird deshalb in Abbildung 11 und 12 ausschließlich der Phosphorylierungsgrad 30 s nach DMSO-Zugabe gezeigt.

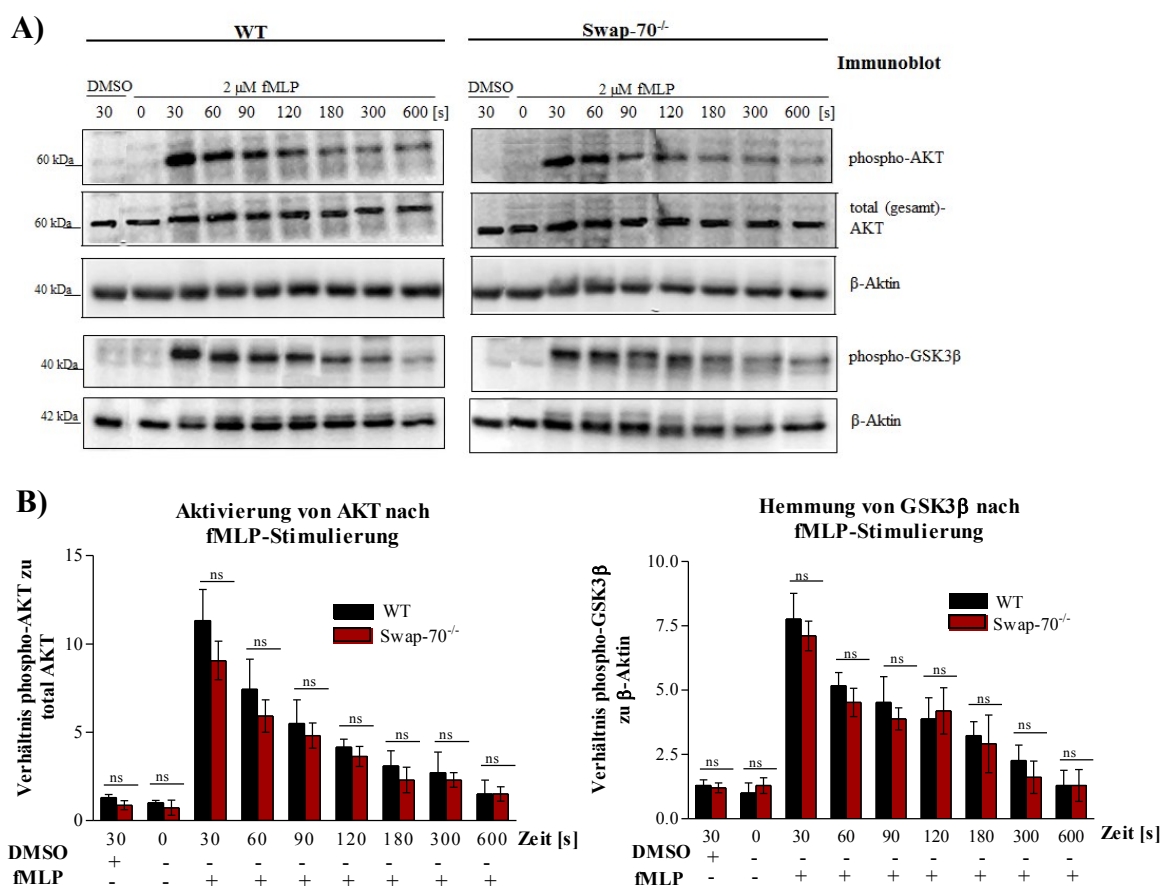
Wie aus Abbildung 11A und 11B hervorgeht, bewirkte die fMLP-Stimulierung eine reversible Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 in den WT-Zellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem Aktivierungsmaximum nach 30 s. Danach verringerte sich der Anteil aktivierter MAP-Kinasen. Die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen zeigten gegenüber den WT-Zellen im Zeitraum von 30 s bis 180 s einen signifikant verminderten Anteil an aktivierter MAP-Kinase p42/p44. Ein solch signifikanter Unterschied war für p38 lediglich 30 s nach fMLP-Zugabe erkennbar.



**Abbildung 11: Zeitabhängige Aktivierung der MAP-Kinasen p42/p44 und p38 in neutrophilen Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen nach fMLP-Stimulierung.** **A)** Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^6$  Zellen mit  $2 \mu\text{M}$  fMLP über einen Zeitraum von 600 s stimuliert. Als Negativkontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Gesamtzelllysate im 10 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die phosphorylierte und unphosphorylierte Form der MAP-Kinasen wurden mit den entsprechenden monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Als interne Ladekontrolle diente das *house keeping*-Protein Vinculin. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängig durchgeführten Experimenten. **B)** Densitometrische Auswertung der sechs Experimente mittels TotalLab-Software. Als Maß für die Aktivierung diente das Verhältnis aus phosphorylierter MAP-Kinase zur unphosphorylierten Form. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, die auf unstimulierte WT-Zellen (Wert eins) normalisiert wurden mit signifikanten Werten  $p < 0,001$  (\*\*\*) ,  $p < 0,01$  (\*\*) und nicht signifikanten Werten  $p > 0,05$  (ns).

Die Abbildung 12A und 12B zeigt die reversible Aktivierung von AKT und die Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  in den WT-Zellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen. Die maximale Phosphorylierung von AKT wurde 30 s nach fMLP-Zugabe erreicht und nach 600 s bildete sich die Antwort auf das Ausgangsniveau zurück. Über den gesamten Zeitraum der fMLP-

Stimulierung waren zwischen den WT-Zellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Phosphorylierungsgrad erkennbar. Die Untersuchung der GSK3 $\beta$  Phosphorylierung über den Zeitraum von 0 s bis 600 s zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen. Die maximale Phosphorylierung wurde auch hier 30 s nach fMLP-Zugabe erreicht und nach 600 s bildete sich die Antwort auf das Ausgangsniveau zurück. Da der Antikörper für die Untersuchung der unphosphorylierten Form von GSK3 $\beta$  nicht zuverlässig arbeitete, wurde die Phosphorylierung mit Hilfe der Ladekontrolle (Aktin) ermittelt.



**Abbildung 12: Zeitabhängige Aktivierung von AKT und Hemmung von GSK3 $\beta$  in neutrophilen Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen nach fMLP-Stimulierung.** A) Pro Ansatz wurden 2 x 10<sup>6</sup> Zellen mit 2  $\mu$ M fMLP über einen Zeitraum von 600 s stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und das Gesamtzelllysate im 10 %igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Als Negativkontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. Die phosphorylierte und unphosphorylierte Form der Proteine wurde immunologisch im Western Blot nachgewiesen. Als interne Ladekontrolle diente das *house keeping*-Protein  $\beta$ -Aktin. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von sechs unabhängig durchgeführten Experimenten. B) Densitometrische Auswertung der sechs Experimente mittels TotalLab-Software. Als Maß für die Aktivierung diente das Verhältnis aus phosphorylierter AKT zur unphosphorylierten Form. Der Anteil an inhibierter GSK3 $\beta$  wurde durch das Verhältnis aus der phosphorylierten Form zur Ladekontrolle ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, die auf unstimulierte WT-Zellen (Wert eins) normalisiert wurden, p > 0,05 (ns).



## **5.6 SWAP-70 ist nicht in die Migration und Aktinpolymerisierung eingebunden**

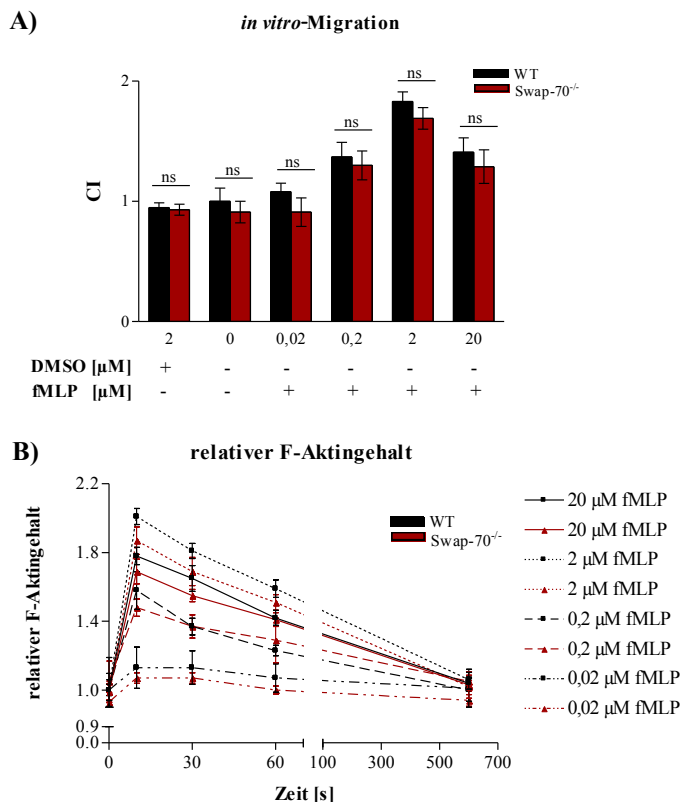
Es ist bekannt, dass SWAP-70 die Migration sowie die Reorganisation des Aktinzytoskeletts in verschiedenen murinen Immunzellen reguliert (Sivalenka und Jessberger 2004, Pearce et al. 2006, Pearce et al. 2011, Bahaie et al. 2012). Die nächste Fragestellung galt daher der Bedeutung von SWAP-70 für die *in vitro*-Migration sowie die Aktinpolymerisierung muriner neutrophiler Granulozyten. Die *in vitro*-Migration wurde in Abhängigkeit verschiedener fMLP-Konzentrationen (0,02  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  fMLP) mit Hilfe eines Transwell-Migrationssystems untersucht. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt und anschließend wurde der chemotaktische Index (CI) bestimmt. Die Negativkontrolle DMSO induzierte unabhängig der eingesetzten Konzentrationen (0,02  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  DMSO) keine Migration der Zellen. Aus diesem Grund wurde als repräsentatives Ergebnis in Abbildung 13A lediglich die Migration der Zellen in Anwesenheit von 2  $\mu\text{M}$  DMSO gezeigt. Für die Untersuchung der Aktinpolymerisierung wurden die Zellen, wie unter 4.1.5 beschrieben, mit verschiedenen fMLP-Konzentrationen (0,02  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  fMLP) stimuliert. Anschließend wurde der relative F-Aktin Gehalt, der sich aus dem Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von fMLP-stimulierten zu unstimulierten Zellen ergab, mit Hilfe von NBD-Phalloidin durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13B dargestellt.

Der Abbildung 13A ist zu entnehmen, dass mit steigender fMLP-Konzentration die WT-Zellen und die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen verstärkt migrierten. Die maximale migratorische Antwort wurde bei 2  $\mu\text{M}$  fMLP erreicht. Eine höhere fMLP-Konzentration (20  $\mu\text{M}$  fMLP) führte zu einer verminderten Migration der Zellen. Bei keiner verwendeten fMLP-Konzentration waren signifikante Unterschiede zwischen den WT-Zellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen erkennbar.

Abbildung 13B zeigt die transiente Aktinpolymerisierung (F-Aktin) in Abhängigkeit verschiedener fMLP-Konzentrationen (0,02  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  fMLP). Bei allen eingesetzten fMLP-Konzentrationen erreichten die WT-Zellen und die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen nach 10 s den maximalen relativen F-Aktin Gehalt, wodurch bekannte Literaturdaten bestätigt wurden (Wallace et al. 1984). Anschließend verringerte sich dieser bis nach 10 min die Ausgangswerte erreicht wurden. Die größtmögliche Aktinpolymerisierung in den WT-Zellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen induzierte die Stimulierung mit 2  $\mu\text{M}$  fMLP. Der anfängliche relative F-Aktin Gehalt wurde hierbei verdoppelt. Zwischen den WT-Zellen und

den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen waren bei keiner eingesetzten fMLP-Konzentration und zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikante Unterschiede erkennbar.

Die Experimente belegen deutlich, dass SWAP-70 in fMLP-stimulierten murinen neutrophilen Granulozyten weder für die Migration noch für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts bedeutsam ist.



**Abbildung 13: *In vitro*-Migration und Aktinpolymerisierung (F-Aktin) neutrophiler Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen in Abhängigkeit der fMLP-Konzentration.** **A)** Die Migration wurde mit Hilfe eines Transwell-Migrationssystems untersucht. Pro Ansatz migrierten  $5 \times 10^5$  Zellen über einen Zeitraum von 90 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Richtung verschiedener fMLP-Konzentrationen, des Mediums oder in Richtung der Negativkontrolle DMSO. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt und der chemotaktische Index (CI) bestimmt. Der CI-Wert unstimulierter WT-Zellen erhielt den Wert eins und die erhaltenen Werte wurden zu diesem ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die CI  $\pm$  SEM aus 7 unabhängigen Experimenten und  $p > 0,05$  (ns). **B)** Die Aktinpolymerisierung (F-Aktin) von jeweils 30.000 Zellen wurde mittels NBD-Phalloidin durchflusszytometrisch bestimmt. Der relative F-Aktin gehalt ergab sich aus dem Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von fMLP-stimulierten zu unstimulierten Zellen. Alle erhaltenen Werte wurde zu den unstimulierten WT-Zellen (Wert eins) ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Experimenten und  $p > 0,05$  (ns).

### **5.7 SWAP-70 beeinflusst die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche, die CD11b-Proteinmenge und die CD11b-Genexpression**

In murinen eosinophilen Granulozyten beeinflusst SWAP-70 die Verteilung und die Lokalisierung des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche (Bahaie et al. 2012). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Bedeutung von SWAP-70 für die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche muriner neutrophiler Granulozyten untersucht. Es wurden hierfür jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen über einen Zeitraum von 50 min mit  $2 \mu\text{M}$  fMLP stimuliert. Anschließend wurden sie mit einem fluorochrommarkierten anti-CD11b Antikörper inkubiert. Die Lokalisierung von CD11b ergab sich aus dem Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) fMLP-stimulierter zu unstimulierten Zellen.

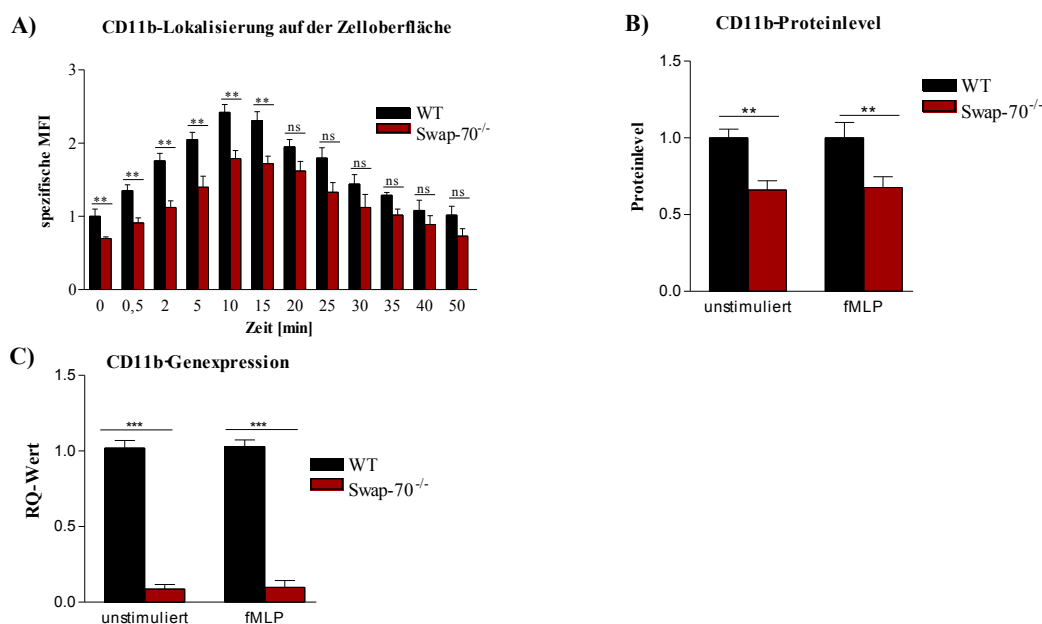
Die Abbildung 14A zeigt den zeitlichen Verlauf der Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche fMLP-stimulierter WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen. Es ist erkennbar, dass dieser in beiden Zellen ähnlich war, wobei die größtmögliche Lokalisierung 10 min bis 15 min nach fMLP-Zugabe erreicht wurde. Danach verminderte sich die Anzahl von CD11b auf der Zelloberfläche. Die Ausgangswerte wurden 50 min nach fMLP-Zugabe erreicht. Die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen wiesen gegenüber den WT-Zellen bereits im unstimulierten Zustand eine signifikant verminderte Anzahl von CD11b auf der Zelloberfläche auf. Diese signifikant verringerte Lokalisierung von CD11b in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen war über einen Zeitraum von 15 min der fMLP-Stimulierung erkennbar.

Um zu klären, ob die verminderte Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche in unstimulierten und fMLP-stimulierten Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen auf eine grundsätzlich veränderte Proteinmenge zurückzuführen ist, wurden Western Blot Experimente durchgeführt. Für die Untersuchung wurde das Gesamtzelllysat von jeweils  $2 \times 10^6$  unstimulierten und fMLP-stimulierten ( $2 \mu\text{M}$  fMLP) WT- Zellen und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nachdem die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert wurden, erfolgte die Detektion von CD11b durch den entsprechenden Antikörper. Da die CD11b-Oberflächenlokalisierung 15 min nach fMLP-Zugabe den Maximalwert erreichte und sich zu diesem Zeitpunkt signifikant zwischen den WT- und den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen unterschied, erfolgte die Untersuchung der CD11b-Proteinmenge ebenfalls zu diesem Zeitpunkt.

Wie Abbildung 14B zeigt, wiesen sowohl die unstimulierten als auch die fMLP-stimulierten Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen gegenüber den WT-Zellen eine signifikant verminderte CD11b-Proteinmenge auf.

Um weiterhin zu untersuchen, inwieweit die verminderte CD11b-Proteinmenge in den unstimulierten und fMLP-stimulierten Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen auf eine veränderte Expression des CD11b-Genes zurückzuführen ist, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Die relative Quantifizierung der CD11b-Genexpression erfolgte mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, wie unter 4.3.3 beschrieben. In Anlehnung an die Untersuchung der CD11b-Proteinmenge, erfolgte die Analyse der CD11b-Genexpression in stimulierten WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen ebenfalls 15 min nach der Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  fMLP.

Aus Abbildung 14C ist zu entnehmen, dass unstimulierte und fMLP-stimulierte Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen eine signifikant verminderte Expression des CD11b-Genes aufwiesen.

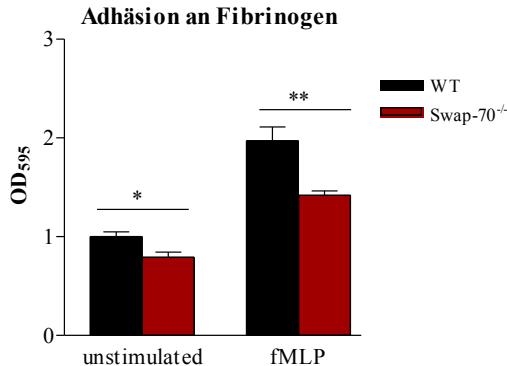


**Abbildung 14: Untersuchung der CD11b-Oberflächenlokalisierung, der CD11b-Proteinmenge sowie der CD11b-Genexpression neutrophiler Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen nach fMLP-Stimulierung.** A) Durchflusszytometrische Analyse des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche. Pro Ansatz wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen mit 2  $\mu\text{M}$  fMLP über einen Zeitraum von 50 min stimuliert. Mit Hilfe eines PE-gekoppelten anti-CD11b Antikörpers wurde die spezifische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt, die sich aus dem Verhältnis der MFI fMLP-stimulierter zu unstimulierten Zellen ergab. Alle erhaltenen Werte wurden zu den unstimulierten WT-Zellen ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die spezifischen MFI  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Experimenten mit signifikanten Werten  $p < 0,01$  (\*\*) bzw. nicht signifikanten Werten  $p > 0,05$  (ns). B) Analyse der CD11b-Proteinmenge in jeweils  $2 \times 10^6$  unstimulierten und fMLP-stimulierten Zellen mittels TotalLab Software. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 15 min mit 2  $\mu\text{M}$  fMLP aktiviert. Die erhaltenen Werte der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen wurden zu den WT-Zellen, die den Wert eins erhielten, ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier durchgeführten Experimenten mit signifikanten Werten  $p < 0,01$  (\*\*). C) Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde in unstimulierten und 2  $\mu\text{M}$  fMLP stimulierten Zellen die CD11b Genexpression untersucht. Anhand der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde der RQ-Wert bestimmt und  $p < 0,001$  (\*\*\*).

## 5.8 SWAP-70 beeinflusst die Adhäsion an Fibrinogen

Für das Oberflächenmolekül CD11b ist bekannt, dass es unter anderem mit dem Glykoprotein Fibrinogen interagiert (Wright et al. 1988, Ugarova und Yakubenko 2001). Um zu prüfen, ob die verminderte Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche Swap-70<sup>-/-</sup>-muriner neutrophiler Granulozyten mit veränderten adhäsiven Prozessen einhergeht, wurde die Adhäsion an Fibrinogen untersucht. Es wurden hierfür jeweils  $5 \times 10^5$  WT-Zellen und Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen die Bindung an Fibrinogen in An- und Abwesenheit von 2  $\mu\text{M}$  fMLP ermöglicht. Nachdem die Zellen fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und lysiert wurden, erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm im ELISA Reader.

Abbildung 15 zeigt eine signifikant verminderte Adhäsion unstimulierter und fMLP-stimulierter Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen an Fibrinogen im Vergleich zu WT-Zellen. Die Adhäsion unstimulierter Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen war gegenüber den WT-Zellen um rund 22 % verringert. Im Falle der fMLP-Stimulierung adhärten rund 32 % weniger Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen als WT-Zellen. Anhand der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die SWAP-70 die Adhäsion muriner neutrophiler Granulozyten an Fibrinogen beeinflusst.



**Abbildung 15: Adhäsion neutrophiler Granulozyten von WT- und Swap-70<sup>-/-</sup>-Mäusen an Fibrinogen in Abhängigkeit von fMLP.** Die Adhäsion unstimulierter und 2  $\mu\text{M}$  fMLP-stimulierter Zellen (pro Ansatz  $5 \times 10^5$ ) an 20  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen wurde photometrisch untersucht. Die Zellen adhärten an Fibrinogen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 15 min. Anschließend wurde Absorption bei 595 nm im ELISA Reader gemessen. Die erhaltenen Werte wurden zu den unstimulierten WT-Zellen ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit signifikanten Werten  $p < 0,05$  (\*) und  $p < 0,01$  (\*\*).

## **6 Diskussion**

Das PIP<sub>3</sub>-bindende Signalprotein SWAP-70 reguliert in murinen Immunzellen, wie B-Zellen, Mastzellen, dendritischen Zellen und eosinophilen Granulozyten verschiedene zelluläre Antworten (Gross et al. 2002, Sivalenka und Jessberger 2004, Pearce et al. 2006, Quemeneur et al. 2008, Sivalenka et al. 2008, Ocana-Morgner et al. 2009, Peacre et al. 2011, Ocana-Morgner et al. 2011, Bahaie et al. 2012). Die vorliegende Arbeit zeigte erstmals eine funktionelle Bedeutung von SWAP-70 in der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion neutrophiler Granulozyten, die aus murinem Knochenmark stammen. Für die Untersuchungen wurden neutrophile Granulozyten von WT- und homozygoten Swap-70-defizienten Mäusen verwendet. Die Arbeit leistet damit einen wesentlichen Beitrag zur weiterführenden Charakterisierung der Funktion von SWAP-70 in murinen Immunzellen und unterstreicht die Multifunktionalität des Signalproteins.

### **6.1 Murine neutrophile Granulozyten synthetisieren SWAP-70**

Es ist bekannt, dass murine Immunzellen, wie eosinophile Granulozyten, B-Zellen, dendritische Zellen sowie Mastzellen, das Protein SWAP-70 synthetisieren (Sivalenka und Jessberger 2004, Pearce et al. 2006, Ocana-Morgner et al. 2009, Bahaie et al. 2012). Demgegenüber konnte das Signalprotein in murinen Makrophagen und murinen T-Zellen nicht nachgewiesen werden (Borggreffe et al. 1999). Mittels Western Blot konnte in dieser Arbeit erstmals in murinen neutrophilen Granulozyten SWAP-70 nachgewiesen werden. Diese Zellen sind damit ein weiteres Beispiel muriner Immunzellen, die SWAP-70 synthetisieren.

### **6.2 SWAP-70 begünstigt die Aktivierung der Rac2-GTPase**

Die Untersuchung der Aktivierung der Rac-GTPasen zeigte in fMLP-stimulierten Swap-70<sup>-/-</sup>-neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den WT-neutrophilen Granulozyten eine signifikant verminderte, aber verbleibende Aktivierung der Rac2-GTPase. Die Aktivierung der Rac1-GTPase unterschied sich hingegen nicht signifikant. SWAP-70

differenziert in murinen neutrophilen Granulozyten demnach zwischen den Rac-Isoformen. Es leitet Signale vom fMLP-Rezeptor zur Rac2-GTPase weiter und begünstigt die Aktivierung dieser GTPase. Die Aktivierung kann hierbei direkt oder indirekt durch SWAP-70 beeinflusst werden. Im Falle einer direkten Beeinflussung würde SWAP-70 als Rac2-spezifischer GEF fungieren. Die Unterscheidung zwischen den Rac-Isoformen unterstützt die Annahme verschiedener Arbeitsgruppen, dass die Isoformen in zellulären Antworten muriner neutrophiler Granulozyten unterschiedliche Bedeutungen aufweisen (Roberts et al. 1999, Kim und Dinauer 2001, Li et al. 2002, Gu et al. 2003, Glogauer et al. 2003, Sun et al. 2004). Es wurde demonstriert, dass die Rac2-GTPase maßgeblich die ROS-Produktion sowie die Adhäsion und Migration beeinflusst (Roberts et al. 1999, Kim und Dinauer 2001, Li et al. 2002, Gu et al. 2003, Sun et al. 2004). Die Rac1-GTPase ist für die Migration, die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, jedoch nicht für die ROS-Produktion bedeutsam (Glogauer et al. 2003, Sun et al. 2004).

Die bereits erwähnte verbleibende Rac2-Aktivität in den fMLP-stimulierten Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen könnte auf Signalmoleküle zurückzuführen sein, die ebenfalls die Aktivierung der Rac2-GTPase beeinflussen. In Abhängigkeit des Tripeptids fMLP begünstigen in murinen neutrophilen Granulozyten unter anderem der *PIP<sub>3</sub>-dependent Rac exchanger 1* (P-Rex1) und der *dedicator of cytokinesis 2* (DOCK2) die Aktivierung der Rac2-GTPase (Welch et al. 2005, Dong et al. 2005, Kunisaki et al. 2006). Hierbei weist P-Rex-1, wie SWAP-70, eine Spezifität für die Rac2-GTPase auf, während DOCK2 die Aktivierung der Rac1- und der Rac2-GTPase beeinflusst (Welch et al. 2005, Dong et al. 2005, Kunisaki et al. 2006). SWAP-70 ist damit ein weiterer Bestandteil eines komplexen Netzwerkes, das für die koordinierte Aktivierung der Rac2-GTPase notwendig ist. Eine koordinierte Aktivierung der Rac2-GTPase ist wiederum für fein regulierte Zellantworten erforderlich.

In murinen neutrophilen Granulozyten begünstigt SWAP-70 die Aktivierung der Rac2-GTPase, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. In murinen Mastzellen differenziert es nicht zwischen den Rac-Isoformen, sondern begünstigt die Aktivierung der Rac1- und der Rac2-GTPase (Sivalenka und Jessberger 2004). In murinen dendritischen Zellen begünstigt es die Aktivierung der Rac1-GTPase und inhibiert interessanter Weise die Aktivierung der RhoA-GTPase (Ocana-Morgner et al. 2009, Ocana-Morgner et al. 2011). Die RhoA-GTPase ist in Swap-70<sup>-/-</sup>-dendritischen Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen unabhängig von einem aktivierenden Stimulus konstitutiv aktiv (Ocana-Morgner et al. 2009, Ocana-

Morgner et al. 2011). SWAP-70 begünstigt oder inhibiert demnach in Abhängigkeit des Zelltypes die Aktivierung verschiedener Rho-GTPasen, was die Multifunktionalität des Signalproteins unterstreicht.

### **6.3 SWAP-70 beeinflusst die ROS-Produktion**

Die fMLP-stimulierten Swap-70<sup>-/-</sup>-neutrophilen Granulozyten produzierten in An- und Abwesenheit von LPS oder TNF $\alpha$  signifikant weniger ROS verglichen mit den WT-neutrophilen Granulozyten. Die ROS-Produktion der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen war im Vergleich zu den WT-Zellen hierbei jeweils um rund 50 % vermindert. Dies deutet darauf hin, dass nicht die LPS- oder TNF $\alpha$ -vermittelte Signaltransduktion, sondern die fMLP-vermittelte Signaltransduktion von SWAP-70 abhängig ist. SWAP-70 beeinflusst demnach allein über die fMLP-vermittelte Signaltransduktion die ROS-Produktion.

Die Beobachtung, dass SWAP-70 teilweise in die ROS-Produktion muriner neutrophiler Granulozyten involviert ist, geht mit dem Ergebnis einher, dass SWAP-70 die Aktivierung der Rac2-GTPase beeinflusst. Die verminderte Aktivierung der Rac2-GTPase könnte demnach eine Ursache für die verminderte ROS-Produktion sein. Es ist bekannt, dass die Rac2-GTPase im aktiven, GTP-gebundenen Zustand für die vollständige Zusammensetzung und Funktion der NADPH-Oxidase und damit für die ROS-Produktion erforderlich ist (Knaus et al. 1991, Bokoch 1995, Babior 1999, Diebold und Bokoch 2001, Bokoch und Diebold 2002, Dinauer 2003). Die aktive Rac2-GTPase bindet die zytosolische Komponente p67<sup>phox</sup> sowie das membrangebundene Flavocytochrom b<sub>558</sub> der NADPH-Oxidase (Diekmann et al. 1994, Hoffman und Cerione 2001, Dinauer 2003). Anschließend ist die Rac2-GTPase am Elektronentransfer von NADPH auf molekularen Sauerstoff beteiligt (Diebold und Bokoch 2001, Dinauer 2003). Die Annahme, SWAP-70 nimmt über die Rac2-GTPase Einfluss auf die ROS-Produktion, wird weiterhin dadurch unterstützt, dass die Rac2-GTPase die dominierende Isoform für die ROS-Produktion muriner neutrophiler Granulozyten ist (Roberts et al. 1999, Kim und Dinauer 2001, Li et al. 2002, Yamauchi et al. 2005).

Trotz der genetischen Inaktivierung von SWAP-70 produzierten die murinen neutrophilen Granulozyten nach fMLP-Stimulierung ROS. Dies deutet auf weitere



Signalproteine hin, die die ROS-Produktion begünstigen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich unter anderem um Vav1, P-Rex-1 oder DOCK2 (Kim et al. 2003, Welch et al. 2005, Dong et al. 2005, Kunisaki et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass SWAP-70 als Bestandteil der komplexen fMLP-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten an der Regulierung der ROS-Produktion beteiligt ist.

#### **6.4 SWAP-70 beeinflusst die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/p44, jedoch nicht die Aktivierung der Proteinkinasen AKT und GSK3 $\beta$**

Die Aktivierung der PI3K $\gamma$  durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins ist ein entscheidendes intrazelluläres Ereignis fMLP-stimulierter neutrophiler Granulozyten. PI3K $\gamma$  bildet daraufhin den intrazellulären Botenstoff PIP $_3$ , der die Proteinkinase AKT zur Plasmamembran transloziert und aktiviert (Hirsch et al. 2000, Li et al. 2000, Sasaki et al. 2000). In dieser Arbeit unterschied sich die Aktivierung von AKT zwischen Swap-70 $^{-/-}$ -Zellen und WT-Zellen nicht signifikant. SWAP-70 ist folglich nicht an der Signalweiterleitung vom fMLP-Rezeptor zur PI3K $\gamma$  beteiligt. Es wird vermutlich durch den PI3K $\gamma$ -abhängigen intrazellulären Botenstoff PIP $_3$  beeinflusst. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass SWAP-70 die Phospholipide PIP $_2$  und PIP $_3$  bindet (Shinohara et al. 2002, Hilpelä et al. 2003, Wakamatsu et al. 2006). Die Bindung an PIP $_3$  ist wichtig für die Translokation zur Plasmamembran sowie für die Interaktion von SWAP-70 mit der Rac-GTPase (Wakamatsu et al. 2006). Ebenso ist denkbar, dass SWAP-70 unabhängig von PIP $_3$ , beispielsweise durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit oder die G $_i$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins beeinflusst wird. Die Arbeitsgruppe um Ocana-Morgner zeigte, dass SWAP-70 in Zelllysaten dendritischer Zellen mit der G $_{\alpha i}$ -Untereinheit interagiert (Ocana-Morgner et al. 2011). Eine Beeinflussung der Aktivierung von P-Rex1 durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten demonstrierten bereits verschiedene Arbeitsgruppen (Welch et al. 2002, Hill et al. 2005).

Weiterhin zeigten Swap-70 $^{-/-}$ -neutrophile Granulozyten im Vergleich zu den WT-neutrophilen Granulozyten eine signifikant verminderte Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und p42/p44. Es sind mindestens zwei Möglichkeiten denkbar, wie SWAP-70 diese MAP-Kinasen beeinflusst. Erstens könnte SWAP-70 direkt mit Proteinen innerhalb der MAP-Kinase Kaskade interagieren. Die Arbeitsgruppe um Buchsbaum zeigte in einer

Fibroblastenzelllinie, dass die Rac-spezifischen GEFs Tiam1 und Grf1 das Gerüstprotein *Islet brain 2/JNK-interacting protein 2* (IB2/JIP2) binden (Buchsbaum et al. 2002). IB2/JIP2 interagiert wiederum mit einem Effektorprotein der Rac-GTPase, der sogenannten Serin/Threonin Kinase MLK3, mit der MAP-Kinase Kinase 3 sowie mit der MAP-Kinase p38 (Buchsbaum et al. 2002). Auf diese Weise beeinflussen Tiam1 und Grf1 über IB2/JIP2 die MAP-Kinase p38. Zweitens könnte SWAP-70 über die Rac2-GTPase die Aktivierung der MAP-Kinasen regulieren. Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten, dass die Rac2-GTPase in murinen neutrophilen Granulozyten in die Aktivierung von p38 bzw. p42/p44 eingebunden ist (Roberts et al. 1999, Kim und Dinauer 2001). Es könnte somit die verminderte Aktivierung der Rac2-GTPase in den Swap-70<sup>-/-</sup>-neutrophilen Granulozyten eine Ursache für die verminderte Aktivierung der genannten MAP-Kinasen sein. Unabhängig über welchen der angeführten Mechanismen SWAP-70 die Aktivierung der MAP-Kinasen beeinflusst, ist es an der Weiterleitung fMLP-vermittelter Signale zu den MAP-Kinasen beteiligt.

Für die MAP-Kinasen p38 und p42/p44 ist bekannt, dass sie in die ROS-Produktion muriner neutrophiler Granulozyten involviert sind (Torres et al. 1993, Thompson et al. 1994, Nick et al. 1997, Zu et al. 1998, Dewas et al. 2000, Dang et al. 2003, Sakamoto et al. 2006). Die verminderte Aktivierung der MAP-Kinasen könnte folglich eine weitere Erklärung für die verringerte ROS-Produktion der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen sein. Es ist daher denkbar, dass SWAP-70 über die MAP-Kinasen p38 und p42/p44 Einfluss auf die ROS-Produktion nimmt. Hierbei beeinträchtigen die MAP-Kinasen die ROS-Produktion vermutlich über die Phosphorylierung der NADPH-Komponente p47<sup>phox</sup> und/oder p67<sup>phox</sup> (El Benna et al. 1996, Dang et al. 2003).

Interessanter Weise begünstigt SWAP-70 die Aktivierung der MAP-Kinase p42/p44 in murinen neutrophilen Granulozyten, während es in murinen Mastzellen die Aktivierung hemmt. Die genetische Inaktivierung von SWAP-70 führt in stimulierten murinen Mastzellen zu einer verstärkten Aktivierung von p42/p44 (Sivalenka und Jessberger 2004, Sivalenka et al. 2008). Im Gegensatz dazu ist der Einfluss von SWAP-70 auf die Aktivierung der MAP-Kinase p38 in murinen Mastzellen (Sivalenka et al. 2008) und murinen neutrophilen Granulozyten ähnlich. In beiden Zelltypen begünstigt es die Aktivierung von p38. SWAP-70 zeigt bezüglich der Aktivierung der MAP-Kinase p42/p44 zelltypspezifische Funktionen, was erneut die Multifunktionalität des Signalproteins unterstreicht.

## **6.5 SWAP-70 beeinflusst nicht die Migration und die Reorganisation des Aktinzytoskeletts**

Die Untersuchung der fMLP-vermittelten Migration und Aktinpolymerisierung zeigte zwischen Swap-70<sup>-/-</sup>-neutrophilen Granulozyten und WT-neutrophilen Granulozyten keine signifikanten Unterschiede. Dies war unerwartet, da SWAP-70 in murinen B-Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen sowie eosinophilen Granulozyten die Migration beeinflusst (Sivalenka und Jessberger 2004, Pearce et al. 2006, Pearce et al. 2011, Ocana-Morgner et al. 2011, Bahaie et al. 2012). Die genetische Inaktivierung von SWAP-70 verminderte die *in vivo*- und/oder *in vitro*-Migration der genannten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Zellen (Sivalenka und Jessberger 2004, Pearce et al. 2006, Ocana-Morgner et al. 2011, Bahaie et al. 2012). Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts war in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Mastzellen und den Swap-70<sup>-/-</sup>-eosinophilen Granulozyten ebenfalls verändert (Sivalenka und Jessberger 2004, Bahaie et al. 2012). Die mit dem Stammzellfaktor stimulierten Swap-70<sup>-/-</sup>-Mastzellen erreichten im Vergleich zu den WT-Zellen die maximale Aktinpolymerisation zu früheren Zeitpunkten. Die Depolymerisierung war hingegen zeitlich verzögert (Sivalenka und Jessberger 2004). Ein ähnliches Verhalten zeigten stimulierte Swap-70<sup>-/-</sup>-eosinophile Granulozyten. Die Aktindepolymerisierung war in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen gegenüber den WT-Zellen ebenfalls zeitlich verzögert (Bahaie et al. 2012). Es kann geschlossen werden, dass SWAP-70 in murinen Immunzellen bezüglich der Migration und der Aktinpolymerisierung zelltypspezifische Funktionen zeigt.

Die Beobachtungen in dieser Arbeit, dass eine verringerte Aktivierung der Rac2-GTPase sowie der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen die Migration nicht beeinträchtigen, scheinen widersprüchlich zu bekannten Literaturdaten zu sein. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten eine Bedeutung der Rac2-GTPase sowie der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 in der Migration fMLP-stimulierter muriner neutrophiler Granulozyten (Roberts et al. 1999, Li et al. 2002, Coxon et al. 2003). Den Einfluss dieser Signalmoleküle auf die Migration demonstrierten die Arbeitsgruppen anhand der Abwesenheit der Aktivität der Signalmoleküle. Die Abwesenheit der Aktivität der Rac2-GTPase und der MAP-Kinasen verminderte die Migration (Roberts et al. 1999, Li et al. 2002, Coxon et al. 2003). In dieser Arbeit war jedoch eine verbleibende Aktivität der genannten Signalmoleküle erkennbar. Es ist denkbar, dass die verbleibende Aktivität in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen ausreicht, um die Migration vollständig zu induzieren.

## **6.6 SWAP-70 beeinflusst die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche und die Adhäsion an Fibrinogen**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche unstimulierter und fMLP-stimulierter Swap-70<sup>-/-</sup>-neutrophiler Granulozyten gegenüber den WT-Zellen signifikant vermindert war. Die verringerte Lokalisierung auf der Zelloberfläche war auf eine verminderte CD11b-Proteinmenge zurückzuführen. Neben der veränderten CD11b-Proteinmenge zeigten die Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen gegenüber den WT-Zellen weiterhin eine signifikant reduzierte CD11b-Genexpression. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass SWAP-70 an der Weiterleitung fMLP-abhängiger Signale in den Zellkern muriner neutrophiler Granulozyten beteiligt ist. Die Fähigkeit des Signalproteins die Genexpression zu beeinflussen, wurde bereits in murinen Mastzellen gezeigt (Sivalenka et al. 2008). In murinen neutrophilen Granulozyten beeinflusst SWAP-70 demzufolge über die CD11b-Genexpression die CD11b-Proteinmenge und damit die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche. Eine Bedeutung von SWAP-70 in der Verteilung und Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche konnte bereits in Eotaxin-1 stimulierten eosinophilen Granulozyten gezeigt werden (Bahaie et al. 2012). Eotaxin-1 ist ein chemotaktischer Stimulus für eosinophile Granulozyten. Allerdings hatte SWAP-70 in unstimulierten murinen eosinophilen Granulozyten keinen Einfluss auf die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche (Bahaie et al. 2012). Dies unterstreicht erneut die Multifunktionalität von SWAP-70.

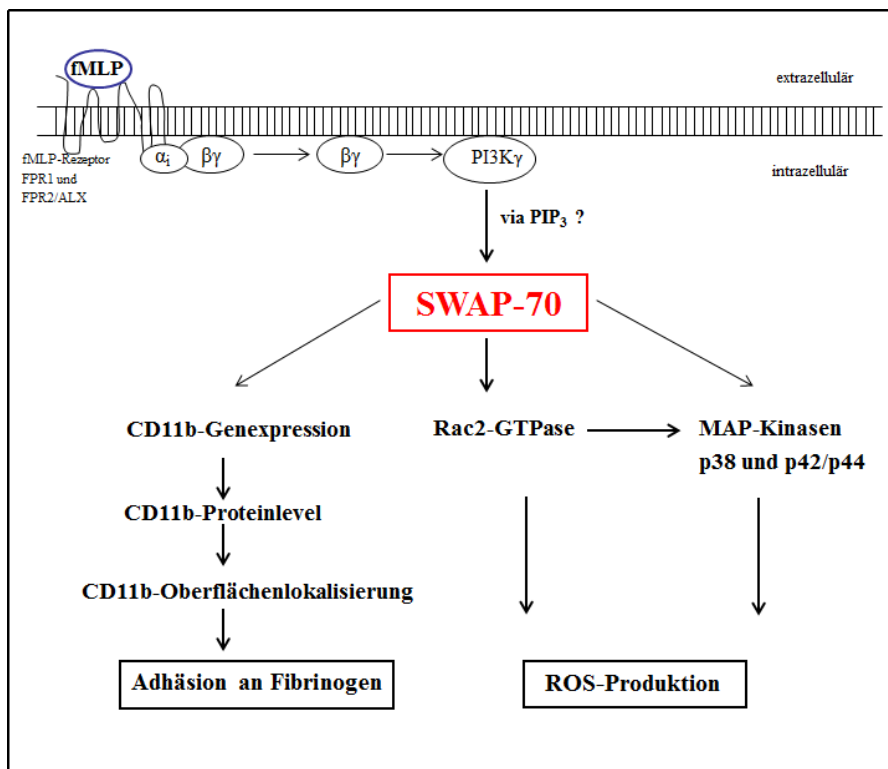
Weiterhin zeigten die Swap-70<sup>-/-</sup>-neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den WT-Zellen in An- und Abwesenheit des Tripeptids fMLP eine signifikant verminderte Adhäsion an Fibrinogen. Diese verringerte Adhäsion an das Glykoprotein ist vermutlich auf die veränderte Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche der Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen zurückzuführen. SWAP-70 beeinflusst wahrscheinlich über die Lokalisierung des Adhäsionsmoleküls CD11b auf der Zelloberfläche die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Fibrinogen. Eine Bedeutung von SWAP-70 in adhäsiven Prozessen konnte bereits in murinen eosinophilen Granulozyten und murinen Mastzellen gezeigt (Sivalenka und Jessberger 2004, Bahaie et al. 2012). Die genetische Inaktivierung von SWAP-70 führte in beiden Zelltypen zu verminderten adhäsiven Prozessen. Im Falle der Mastzellen war die Adhäsion an Fibronectin, unabhängig der Aktivierung der Zellen, reduziert (Sivalenka und Jessberger 2004). Fibronectin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix. Die

Adhäsion stimulierter Swap-70<sup>-/-</sup>-eosinophiler Granulozyten an ICAM-1 und VCAM-1 war gegenüber den WT- eosinophilen Granulozyten verringert (Bahaie et al. 2012). VCAM-1 und ICAM-1 sind Adhäsionsmoleküle, die auf aktiviertem Endothel lokalisiert sind.

### **6.7 Modell der funktionellen Bedeutung von SWAP-70**

Basierend auf den erhaltenen Daten dieser Arbeit und vorangegangener Studien wird das unter Abbildung 16 dargestellte Modell zur funktionellen Bedeutung von SWAP-70 in der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten vorgeschlagen: Die Bindung des Tripeptids fMLP an die Rezeptoren FPR1 und FPR2/ALX auf der Zelloberfläche induziert auf der intrazellulären Membranseite die Dissoziation heterotrimerer G-Proteine in die G $\alpha_i$ - und die G $\beta\gamma$ -Untereinheit (Ye et al. 2009). Das G $\beta\gamma$ -Dimer aktiviert die PI3K $\gamma$ , die daraufhin die Bildung und Akkumulation des intrazellulären Botenstoffs PIP<sub>3</sub> induziert. Das Signalprotein SWAP-70 interagiert wahrscheinlich mit PIP<sub>3</sub> und begünstigt anschließend die Aktivierung der Rac2-GTPase sowie der MAP-Kinasen p38 und p42/p44. Es ist auch denkbar, dass die Rac2-GTPase die Aktivierung der MAP-Kinasen beeinträchtigt (Roberts et al. 1999, Kim und Dinauer 2001). Über die Rac2-GTPase und die MAP-Kinasen beeinflusst SWAP-70 vermutlich die ROS-Produktion. Weiterhin reguliert SWAP-70 die Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche über die Beeinflussung der CD11b-Genexpression. Über die beeinträchtigte Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche beeinflusst SWAP-70 wahrscheinlich die Adhäsion an das Glykoprotein Fibrinogen.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert SWAP-70 als ein multifunktionales Signalmolekül in der fMLP-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten.



**Abbildung 16: Modell der funktionellen Bedeutung von SWAP-70 in der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten.**

Die Bindung des Tripeptids fMLP an die Rezeptoren FPR1 und FPR2/ALX führt auf der intrazellulären Membranseite zur Dissoziation der heterotrimeren G-Proteine in die  $G\alpha_i$ -Untereinheit und das  $G\beta\gamma$ -Dimer. Das  $G\beta\gamma$ -Dimer bewirkt die Aktivierung der  $PI3K\gamma$ , die zur Bildung und Akkumulation von  $PIP_3$  führt. SWAP-70 interagiert mit  $PIP_3$  und beeinflusst daraufhin die Aktivierung der Rac2-GTPase und der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 und reguliert verschiedene zelluläre Antworten.

## **7 Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung von SWAP-70 in der N-Formylpeptid-vermittelten Signaltransduktion muriner neutrophiler Granulozyten charakterisiert. Für die Untersuchungen wurden neutrophile Granulozyten von WT- und homozygoten Swap-70-defizienten (Swap-70<sup>-/-</sup>)-Mäusen verwendet. Die Zellen wurden mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP, ein typisches N-Formylpeptid, stimuliert und charakteristische zelluläre Antworten wurden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass SWAP-70 an der koordinierten Weiterleitung fMLP-vermittelter Signale muriner neutrophiler Granulozyten beteiligt ist. Als Bestandteil der komplexen fMLP-vermittelten Signaltransduktionskaskade wird SWAP-70 vermutlich durch den PI3K $\gamma$ -abhängigen intrazellulären Botenstoff PIP<sub>3</sub> moduliert. Daraufhin beeinflusst es die Signalweiterleitung zur Rac2-GTPase, jedoch nicht zur Rac1-GTPase. Der Einfluss auf die Rac2-GTPase kann hierbei direkt oder indirekt sein. Ein direkter Einfluss könnte darauf hindeuten, dass SWAP-70 als Rac2-spezifischer GEF fungiert. Die Differenzierung zwischen den Rac-Isoformen bestätigt bekannte Literaturdaten, die unterschiedliche Bedeutungen der Rac1- und der Rac2-GTPase in zellulären Antworten muriner neutrophiler Granulozyten aufzeigen. SWAP-70 ist somit eine Möglichkeit die Signalspezifität für die Rac2-GTPase zu vermitteln. Weiterhin beeinflusst SWAP-70 die Signalweiterleitung zu den MAP-Kinasen p38 und p42/p44. Zum einen beeinflusst es die Aktivierung der MAP-Kinasen vermutlich über die Rac2-GTPase, zum anderen agiert es möglicherweise mit Proteinen innerhalb der MAP-Kinase Kaskade. Über die genannten MAP-Kinasen sowie über die Rac2-GTPase reguliert SWAP-70 wahrscheinlich die ROS-Produktion. Die verbleibende ROS-Produktion in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen deutet auf weitere Signalproteine hin, welche die ROS-Produktion begünstigen. Es wird dadurch untermauert, dass die ROS-Produktion durch eine Vielzahl verschiedener Signalmoleküle kontrolliert und reguliert wird und dass SWAP-70 ein Teil dieser komplexen Mechanismen ist.

Weiterhin kann aufgrund der verminderten Expression des CD11b-Genes in den Swap-70<sup>-/-</sup>-Zellen gegenüber den WT-Zellen geschlussfolgert werden, dass SWAP-70 an der Weiterleitung fMLP-vermittelter Signale in den Zellkern muriner neutrophiler Granulozyten beteiligt ist. Die veränderte CD11b-Genexpression führt zu einer verringerten Lokalisierung von CD11b auf der Zelloberfläche. Wahrscheinlich beeinflusst SWAP-70 die Adhäsion der Zellen an Fibrinogen unter anderem über die veränderte Lokalisierung

von CD11b.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und aufgrund bekannter Literaturdaten kann weiterhin auf zelltypspezifische Funktionen von SWAP-70 geschlossen werden. In murinen neutrophilen Granulozyten ist SWAP-70 weder in die Migration noch in die Reorganisation des Aktinzytoskeletts eingebunden, während es unter anderem in murinen Mastzellen und murinen eosinophilen Granulozyten diese Antworten beeinflusst. Auch bezüglich des Einflusses auf intrazelluläre Signalmoleküle weist SWAP-70 Unterschiede auf. In murinen neutrophilen Granulozyten differenziert es zwischen den Rac-Isoformen und begünstigt ausschließlich die Aktivierung der Rac2-GTPase. In murinen Mastzellen begünstigt es die Aktivierung beider Isoformen und in murinen dendritischen Zellen hemmt es die Aktivierung der RhoA-GTPase. Weiterhin ist der Einfluss von SWAP-70 auf die Aktivierung der MAP-Kinase p42/p44 gegensätzlich. In murinen Mastzellen hemmt SWAP-70 die Aktivierung der MAP-Kinase, wohingegen es in murinen neutrophilen Granulozyten die Aktivierung begünstigt. Interessanter Weise ist der Einfluss von SWAP-70 auf die Aktivierung der MAP-Kinase p38 in murinen neutrophilen Granulozyten und murinen Mastzellen ähnlich.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass SWAP-70 an der koordinierten Weiterleitung fMLP-vermittelter Signale in murinen neutrophilen Granulozyten beteiligt ist. Eine koordinierte Signalweiterleitung ist wiederum für abgestufte und kontrollierte Zellantworten erforderlich. Die zelltypspezifischen Funktionen von SWAP-70 unterstreichen die Multifunktionalität des Signalproteins.



## **8 Literaturverzeichnis**

- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21 rac1. *Nature*, 353(6345):668-70.
- Akasaki T, Koga H, Sumimoto H. 1999. Phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent activation of the small GTPase Rac2 in human neutrophils. *J Biol Chem*, 274(25):18055-9.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*, 30:459-89.
- Arnaut MA. 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 75(5):1037-50.
- Ashman LK. 1999. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(10):1037-51.
- Assari T. 2006. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol*, 5:4.
- Babior BM. 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest*, 73:599-601.
- Babior BM. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5):1464-76.
- Babior BM. 2002. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J*, 4(11):1023-4.
- Bahaie NS, Hosseinkhani MR, Ge XN, Kang BN, Ha SG, Blumenthal MS, Jessberger R, Rao SP, Sriramarao P. 2012. Regulation of eosinophil trafficking by SWAP-70 and its role in allergic airway inflammation. *J Immunol*, 188(3):1479-90.
- Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. 1999. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem*, 274(19):13198-204.
- Berkow RL, Dodson MR. 1988. Biochemical mechanisms involved in the priming of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol*, 44(5):345-52.
- Bohnsack JF, Zhou XN. 1992. Divalent cation substitution reveals CD18- and very late antigen-dependent pathways that mediate human neutrophil adherence to fibronectin. *J Immunol*, 149(4):1340-7.
- Bokoch GM. 1995. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol*, 5(3):109-13.

- Bokoch GM, Diebold BA. 2002. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*, 100(8):2692-6.
- Borggreffe T, Wabl M, Akhmedov AT, Jessberger R. 1998. A B-cell-specific DNA recombination complex. *J Biol Chem*, 273(27):17025-35.
- Borggreffe T, Masat L, Wabl M, Riwar B, Cattoretti G, Jessberger R. 1999. Cellular, intracellular, and developmental expression patterns of murine SWAP-70. *Eur J Immunol*, 29(6):1812-22.
- Borggreffe T, Keshavarzi S, Gross B, Wabl M, Jessberger R. 2001. Impaired IgE response in SWAP-70-deficient mice. *Eur J Immunol*, 31(8):2467-75.
- Boyden S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med*, 115:453-466.
- Broudy VC. 1997. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, 90(4):1345-64.
- Buchsbaum RJ, Connolly BA, Feig LA. 2002. Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol*, 22(12):4073-85.
- Burg N, Pillinger M. 2001. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol*, 99(1):7-17.
- Cerione RA, Zheng Y. 1996. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*, 8:216-222.
- Coxon PY, Rane MJ, Uriarte S, Powell DW, Singh S, Butt W, Chen Q, McLeish KR. 2003. MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. *Cell Signal*, 15(11):993-1001.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559):785-9.
- Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. 1976. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*, 58(3):705-15.
- Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidallo MA, El Benna J. 2003. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*, 42(15):4520-6.
- da Silva FM, Massart-Leën AM, Burvenich C. 1994. Development and maturation of neutrophils. *Vet Q*, 16(4):220-5.

- DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest*, 101(2):455-63.
- Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. 2000. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol*, 165(9):5238-44.
- Dewas C., Dang P.M., Gougerot-Pocidalo M.A., El-Benna J. (2003). TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 171 (8): 4392-8.
- Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. 1989. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*, 264:16378-16382.
- Diebold BA, Bokoch GM. 2001. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol*, 2(3):211-5.
- Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A. 1994. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science*, 265(5171):531-3.
- Dinauer MC. 2003. Regulation of neutrophil function by Rac GTPases. *Curr Opin Hematol*, 10:8-15.
- Dong X, Mo Z, Bokoch G, Guo C, Li Z, Wu D. 2005. P-Rex1 is a primary Rac2 guanine nucleotide exchange factor in mouse neutrophils. *Curr Biol*, 15(20):1874-9.
- Eddy RJ, Pierini LM, Maxfield FR. 2002. Microtubule asymmetry during neutrophil polarization and migration. *Mol Biol Cell*, 13(12):4470-83.
- El Benna J, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM. 1996. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Archives of biochemistry and biophysics*, 334:395-400.

- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Wenig G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE. 1998. Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science*, 280:1271-1274.
- Fukui Y, Wakamatsu I, Tachikawa H, Okamura Y, Tanaka T, Ihara S. 2007. Activity of beta3-beta4 loop of the PH domain is required for the membrane targeting of SWAP70. *IUBMB Life*, 59(2):99-103.
- Franck T, Kohlen S, de la Rebière G, Deby-Dupont G, Deby C, Niesten A, Serteyn D. 2009. Activation of equine neutrophils by phorbol myristate acetate or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces a different response in reactive oxygen species production and release of active myeloperoxidase. *Vet Immunol Immunopathol*, 130(3-4):243-50.
- Galbraith PR, Valberg LS, Brown M. 1965. Patterns of granulocyte kinetics in health, infection and in carcinoma. *Blood*, 25:683-92.
- Garbe AI, Roscher A, Schüler C, Lutter AH, Glösmann M, Bernhardt R, Chopin M, Hempel U, Hofbauer LC, Rammelt S, Egerbacher M, Erben RG, Jessberger R. 2012. Regulation of bone mass and osteoclast function depend on the F-actin modulator SWAP-70. *J Bone Miner Res*, 27(10):2085-96.
- Gershoni JM, Palade GE. 1983. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, 131:1-15.
- Gether U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein coupled receptors. *Endocr Rev*, 21:90-113.
- Glogauer M, Marchal CC, Zhu F, Worku A, Clausen BE, Foerster I, Marks P, Downey GP, Dinuer M, Kwiatkowski DJ. 2003. Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J Immunol*, 170(11):5652-7.
- Grinstein S, Furuya W. 1992. Chemoattractant-induced tyrosine phosphorylation and activation of microtubule-associated protein kinase in human neutrophils. *J Biol Chem*, 267(25):18122-5.
- Gross B, Borggreffe T, Wabl M, Sivalenka RR, Bennett M, Rossi AB, Jessberger R. 2002. SWAP-70-deficient mast cells are impaired in development and IgE-mediated degranulation. *Eur J Immunol*, 32(4):1121-8.

- Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, Kwiatkowski DJ, Williams DA. 2003. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science*, 302(5644):445-9.
- Gupta S, Lee A, Hu C, Fanzo J, Goldberg I, Cattoretti G, Pernis AB. 2003. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system. *Hum Immunol*, 64(4):389-401.
- Gupta S, Fanzo JC, Hu C, Cox D, Jang SY, Lee AE, Greenberg S, Pernis AB. 2003. T cell receptor engagement leads to the recruitment of IBP, a novel guanine nucleotide exchange factor, to the immunological synapse. *J Biol Chem*, 278(44):43541-9.
- Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. 1997. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem*, 272:20384-20388.
- Hachiya O, Takeda Y, Miyata H, Watanabe H, Yamashita T, Sendo F. 1995. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol Immunol*, 39(9):715-23.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. 1998. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92:3007-3017.
- Harlan JM, Vedder NB, Winn RK, Rice CL. 1991. Mechanisms and consequences of leukocyte -endothelial interaction. *West J Med*, 155(4):365-9.
- Hart MJ, Eva A, Zangrilli D, Aaronson SA, Evans T, Cerione RA, Zheng Y. 1994. Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the *dbl* oncogene product. *J Biol Chem*, 269(1):62-5.
- Haslett C. 1997. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br Med Bull*, 53(3):669-83.
- Haslett C, Lee A, Savill JS, Meagher L, Whyte MK. 1991. Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. *Chest*, 99(3 Suppl):6S.
- Heuertz RM, Tricomi SM, Ezekiel UR, Webster RO. 1999. C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement. *J Biol Chem*, 274(25):17968-74.

- Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT. 1994. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and 67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem*, 269(49): 30749-52.
- Hill K, Krugmann S, Andrews SR, Coadwell WJ, Finan P, Welch HC, Hawkins PT, Stephens LR. 2005. Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and G $\beta\gamma$  subunits. *J Biol Chem*, 280(6):4166-73.
- Hilpelä P, Oberbanscheidt P, Hahne P, Hund M, Kalhammer G, Small JV, Bähler M. 2003. SWAP-70 identifies a transitional subset of actin filaments in motile cells. *Mol Biol Cell*, 14(8):3242-53.
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*, 287(5455):1049-53.
- Hoffman GR, Cerione RA. 2001. Rac inserts its way into the immune response. *Nat Immunol*, 2(3):194-6.
- Howard TH, Meyer WH. 1984. Chemotactic peptide modulation of actin assembly and locomotion in neutrophils. *J Cell Biol*, 98:1265-1271.
- Ihara S, Oka T, Fukui Y. 2006. Direct binding of SWAP-70 to non-muscle actin is required for membrane ruffling. *J Cell Sci*, 119(Pt 3):500-7.
- Ishikawa K, Nagase T, Suyama M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. 1998. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res*, 5(3):169-76.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M, Hrsg. 2002. *Immunologie*. Fünfte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Kim C, Dinauer MC. 2001. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol*, 166(2):1223-32.
- Kim C, Marchal CC, Penninger J, Dinauer MC. 2003. The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol*, 171(8):4425-30.

- Kitaura J, Song J, Tsai M, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Mocsai A, Kawakami Y, Liu FT, Lowell CA, Barisas BG, Galli SJ, Kawakami T. 2003. Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcepsilonRI. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(22):12911-6.
- Klebanoff SJ. 1980. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med*, 93:480-489.
- Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. 1991. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science*, 254(5037):1512-5.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. 2005. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol*, 78(6):1408-18.
- Kular G, Loubtchenkov M, Swigart P, Whatmore J, Ball A, Cockcroft S, Wetzker R. 1997. Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide 3-kinase gamma in the formyl-methionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem J*, 325(Pt2):299-301.
- Kueng W, Silber E, Eppenberger U. 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*, 182(1):16-9.
- Kunisaki Y, Nishikimi A, Tanaka Y, Takii R, Noda M, Inayoshi A, Watanabe K, Sanematsu F, Sasazuki T, Sasaki T, Fukui Y. 2006. DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol*, 174(5):647-52.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.
- Lamarche N, Hall A. 1994. GAPs for rho-related GTPases. *Trends in Genetics*, 10:436-440.
- Lemmon MA, Ferguson KM. 2000. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*, 350:1-18.
- Le Y, Murphy PM. 2002. Formyl-Peptide receptors revisited. *Trends Immunol*, 23(11):541-8.

- Li Y, Zhu H, Kuppasamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA. 1998. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem*, 273(4):2015-23.
- Li S, Yamauchi A, Marchal CC, Molitoris JK, Quilliam LA, Dinauer MC. 2002. Chemoattractant-stimulated Rac activation in wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. *J Immunol*, 169(9):5043-51.
- Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. 2000. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*, 287(5455): 1046-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8.
- Martinet N, Martinet Y, Vignaut JM, Plenat F. 1994. Blood monocyte chemotaxis. *J Immunol Meth*, 174:209-214.
- Masat L, Caldwell J, Armstrong R, Khoshnevisan H, Jessberger R, Herndier BIM, Ferrick D. 2000. Association of SWAP-70 with the B cell antigen receptor complex. *WabProc Natl Acad Sci USA*, 97(5):2180-4.
- Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E. 2000. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol*, 164(8):4321-31.
- Mosesson MW. 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*, 3(8):1894-904.
- Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Knall C, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS. 1997. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest*, 99(5):975-86.
- Oberbanscheidt P, Balkow S, Kühnl J, Grabbe S, Bähler M. 2007. SWAP-70 associates transiently with macropinosomes. *Eur J Cell Biol*, 86(1):13-24.
- Ocana-Morgner C, Wahren C, Jessberger R. 2009. SWAP-70 regulates RhoA/RhoB-dependent MHCII surface localization in dendritic cells. *Blood*, 113(7):1474-82.



- Ocana-Morgner C, Reichardt P, Chopin M, Braungart S, Wahren C, Gunzer M, Jessberger R. 2011. Sphingosine 1-phosphate-induced motility and endocytosis of dendritic cells is regulated by SWAP-70 through RhoA. *J Immunol*, 186(9):5345-55.
- Ocana-Morgner C, Götz A, Wahren C, Jessberger R. 2013. SWAP-70 restricts spontaneous maturation of dendritic cells. *J Immunol*, 190(11):5545-58.
- Offermanns S. 2003. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol*, 83:101-130.
- Oldham WM, Hamm HE. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:60-71.
- Olofsson B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, 11:545-54.
- Panaro MA, Mitolo V. 1999. Cellular responses to fMLP challenging: a mini review. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 21(3):397-419.
- Panaro MA, Acquafredda A, Sisto M, Lisi S, Maffione AB, Mitolo V. 2006. Biological role of the N-formyl peptide receptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 28(1):103-27.
- Pearce G, Angeli V, Randolph GJ, Junt T, von Andrian U, Schnittler HJ, Jessberger R. 2006. Signaling protein SWAP-70 is required for efficient B cell homing to lymphoid organs. *Nat Immunol*, 7(8):827-34.
- Pearce G, Audzevich T, Jessberger R. 2011. SYK regulates B-cell migration by phosphorylation of the F-actin interacting protein SWAP-70. *Blood*, 117(5):1574-84.
- Price TH, Chatta GS, Dale DC. 1996. Effect of recombinant granulocyte colony stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood*, 88(1):335-40.
- Prossnitz ER, Ye RD. 1997. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther*, 74(1):73-102.
- Quemeneur L, Angeli V, Chopin M, Jessberger R. 2008. SWAP-70 deficiency causes high-affinity plasma cell generation despite impaired germinal center formation. *Blood*, 111(5):2714-24.
- Rebecchi MJ, Scarlata S. 1998. Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27:503-28.

- Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, Spaetti A, Pollock JD, Borneo JB, Bradford GB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Williams DA. 1999. Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity*, 10(2):183-96.
- Rossman KL, Der CJ, Sondek J. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:167-80.
- Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. 1988. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg*, 69(2):155-70.
- Sakamoto K, Kuribayashi F, Nakamura M, Takeshige K. 2006. Involvement of p38 MAP kinase in not only activation of the phagocyte NADPH oxidase induced by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine but also determination of the extent of the activity. *J Biochem*, 140(5):739-45.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*, 287(5455):1040-6.
- Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(3):1059-62.
- Schmidt A, Hall A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, 16(13):1587-609.
- Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol*, 78(5):1025-42.
- Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N, Higuchi M, Gotoh Y, Ihara S, Nagata S, Itoh H, Fukui Y, Jessberger R. 2002. SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature*, 416(6882):759-63.
- Shirsat NV, Pignolo RJ, Kreider BL, Rovera G. 1990. A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells. *Oncogene*, 5:769-772.

- Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. 2003. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care*, 7(4):291-307.
- Sivalenka RR, Sinha M, Jessberger R. 2008. SWAP-70 regulates mast cell FcεRI-mediated signaling and anaphylaxis. *Eur J Immunol*, 38(3):841-54.
- Sivalenka RR, Jessberger R. 2004. SWAP-70 regulates c-kit-induced mast cell activation, cell-cell adhesion, and migration. *Mol Cell Biol*, 24(23):10277-88.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252:802-808.
- Smith CW. 1993. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol*, 30:45-53.
- Sun CX, Downey GP, Zhu F, Koh AL, Thang H, Glogauer M. 2004. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood*, 104(12):3758-65.
- Tanaka Y, Bi K, Kitamura R, Hong S, Altman Y, Matsumoto A, Tabata H, Lebedeva S, Bushway PJ, Altman A. 2003. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells. *Immunity*, 18(3):403-14.
- Theriot JA, Mitchison TJ. 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*, 352(6331):126-31.
- Thompson HL, Marshall CJ, Saklatvala J. 1994. Characterization of two different forms of mitogen-activated protein kinase kinase induced in polymorphonuclear leukocytes following stimulation by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem*, 269(13):9486-92.
- Torres M, Hall FL, O'Neill K. 1993. Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J Immunol*, 150(4):1563-77.
- Ugarova TP, Yakubenko VP. 2001. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann NY Acad Sci*, 936:368-85.
- Van Haastert PJ, Devreotes PN. 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8):626-34.
- Vega FM, Ridley AJ. 2007. SnapShot: Rho family GTPases. *Cell*, 129(7):1430.

- Vosbeck K, Tobias P, Mueller H, Allen RA, Arfors KE, Ulevitch RJ, Sklar LA. 1990. Priming of polymorphonuclear granulocytes by lipopolysaccharides and its complexes with lipopolysaccharide binding protein and high density lipoprotein. *J Leukoc Biol*, 47(2):97-104.
- Wakamatsu I, Ihara S, Fukui Y. 2006. Mutational analysis on the function of the SWAP-70 PH domain. *Mol Cell Biochem*, 293(1-2):137-45.
- Wallace PJ, Wersto RP, Packman CH, Lichtman MA. 1984. Chemotactic peptide-induced changes in neutrophil actin conformation. *J Cell Biol*, 99(3):1060-5.
- Welch HC, Condliffe AM, Milne LJ, Ferguson GJ, Hill K, Webb LM, Okkenhaug K, Coadwell WJ, Andrews SR, Thelen M, Jones GE, Hawkins PT, Stephens LR. 2005. P-Rex1 regulates neutrophil function. *Curr Biol*, 15(20):1867-73.
- Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT, Stephens LR. 2002. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, 108(6):809-21.
- Whitehead IP, Campbell S, Rossman KL, Der CJ. 1997. Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1332(1):F1-23.
- Williams MA, Solomkin JS. 1999. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J Leukoc Biol*, 65(6):725-36.
- Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, Levine JE, Petryniak B, Derrow CW, Harris C, Jia B, Zheng Y, Ambruso DR, Lowe JB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Boxer L. 2000. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood*, 96(5):1646-54.
- Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. 1988. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(20):7734-8.
- Yamauchi A, Marchal CC, Molitoris J, Pech N, Knaus U, Towe J, Atkinson SJ, Dinauer MC. 2005. Rac GTPase isoform-specific regulation of NADPH oxidase and chemotaxis in murine neutrophils in vivo. Role of the C-terminal polybasic domain. *J Biol Chem*, 280(2):953-64.

- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM. 2009. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev*, 61:119-161.
- Zheng Y. 2001. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem, Sci* 26:724-32.
- Zu YL, Qi J, Gilchrist A, Fernandez GA, Vazquez-Abad D, Kreutzer DL, Huang CK, Sha'afi RI. 1998. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol*, 160(4):1982-9.

## **9 Anhang**

### **9.1 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Johannes Norgauer danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit diese Arbeit an der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena anfertigen zu dürfen. Des Weiteren danke ich ihm für seine wissenschaftliche Förderung.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Jessberger an der Medizinischen Fakultät "Carl Gustav Carus" der TU Dresden für seine methodischen Anregungen und seine Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten, bedanken.

Mein Dank gilt außerdem PD Dr. Jörg Müller am Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU für seine Unterstützung und Ermutigung sowie die Bereitschaft die Arbeit zu begutachten.

Herrn PD Dr. Ignacio Rubio am Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU, möchte ich für die Möglichkeit die Methode des *Pulldowns* zu erlernen, danken.

Ein herzlicher Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe der Abteilung der Experimentellen Dermatologie für die immerwährende Hilfsbereitschaft, methodische sowie wissenschaftliche Problemdiskussionen.

## **9.2 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. J. Norgauer, Herr Prof. Dr. R. Jessberger, Herr PD Dr. J. Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Susann Piehler