

**Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**
Arbeitsgruppe Klinische Biochemie
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Modulation inflammatorischer Prozesse mittels GPI-verankerter
Chemokin-Analoga**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jérôme Jean-Alexandre Huppertz

aus

Essen

Jahr

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Peter J. Nelson

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Karsten Spiekermann
Priv. Doz. Dr. Carole Bourquin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

I INHALT:

<u>I</u>	<u>INHALT:</u>	<u>3</u>
<u>II</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>5</u>
<u>III</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>7</u>
	CHEMOKINE	7
	DAS CHEMOKIN CCL5/RANTES	8
	CHEMOKIN-REZEPTOREN	10
	CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN IN DER TRANSPLANTAT-ABSTOBUNG	12
	BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON CHEMOKINEN	14
	GLYKOINOSITOL-PHOSPHOLIPID-ANKER	16
	CHEMOKINE UND DIE TH-1/TH-2 ZELLEN IMMUNANTWORT	18
	DAS VIRALE MAKROPHAGEN INFLAMMATORISCHE PROTEIN-II	19
	FRAGESTELLUNG UND EXPERIMENTELLE STRATEGIE	20
<u>IV</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN:</u>	<u>22</u>
	VORBEMERKUNG	22
	MATERIALIEN UND PUFFER	22
	CHEMIKALIEN UND ENZYME	22
	BAKTERIENSTÄMME UND AGARPLATTEN FÜR DEREN KULTUR	22
	KULTURMEDIENTEN	23
	ALLGEMEINE PUFFER	24
	HERSTELLUNG VON PLASMIDEN UND MUTATIONEN	27
	SEQUENZIERUNG VON PLASMID-DNA	29
	LIGATION	30
	ZELLINIEN	31
	TRANSFEKTION	31
	ZELLKULTUR	32
	CHO-ZELLEN	32
	HYBRIDOM-ZELLEN	33
	FACS-ANALYSE	33
	PROTEIN-EXTRAKTION	34
	PROTEIN-ISOLIERUNG	34
	FPLC	34
	IMMUNOAFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE	35
	AK-PRODUKTION UND REINIGUNG	35
	IMMUNOAFFINITÄTS-SEPHAROSE	36
	UNSPECIFISCHE KONTROLLSEPHAROSE	37
	REINIGUNGSPROTOKOLL	37
	KATIONEN-AUSTAUSCHER	38
	CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN	38
	HEPARIN CHROMATOGRAPHIE	39
	CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN	39
	GELFILTRATIONS-CHROMATOGRAPHIE	41
	VOLUMENREDUKTION	41
	CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN	41
	DIALYSE/PUFFERWECHSEL	42
	WESTERNBLOT/SILVERSTAIN	43
	WESTERN BLOT	43
	SILBERFÄRBUNG	44

CCL5 ELISA	44
PROTEINMENGENBESTIMMUNG	44
IN-VITRO VERSUCHE	45
REINKORPORATION IN CHO-ZELLEN	45
REINKORPORATION IN HUMVEC-ZELLEN	46
GPI-ANKER Abspaltung durch Phospholipase C	46
SONSTIGE MATERIALIEN	46
<u>V</u> <u>ERGEBNISSE:</u>	<u>48</u>
KONSTRUKTION DER CHEMOKIN-BASIERTEN ANTAGONISTEN	49
ANALYSE DER CHO-ZELLEN OBERFLÄCHENEXPRESSION	50
PROTEIN-EXTRAKTION	53
CCL5-KONSTRUKTE	54
PROTEIN-ISOLIERUNG	55
IMMUNOAFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE	55
KATIONEN-AUSTAUSCHER	57
HEPARIN CHROMATOGRAPHIE	60
SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHIE	63
GPI-VERANKERTES VIRALES MAKROPHAGENINHIBITORISCHES PROTEIN II (vMIP-GPI)	66
IN-VITRO VERSUCHE	67
REINKORPORATION VON MET-RANTES-GPI IN CHO-ZELLEN	67
REINKORPORATION VON MET-RANTES-GPI IN HUMVEC-ZELLEN	68
<u>VI</u> <u>DISKUSSION</u>	<u>70</u>
PROTEIN-ENGINEERING UND OBERFLÄCHENEXPRESSION	72
PROTEIN-ISOLIERUNG	73
REINTEGRATION	74
AUSBlick	74
<u>VII</u> <u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>76</u>
<u>VIII</u> <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>78</u>
<u>IX</u> <u>DANKSAGUNG</u>	<u>84</u>
<u>X</u> <u>CURRICULUM VITAE</u>	<u>85</u>

II ZUSAMMENFASSUNG

Die direkte Rekrutierung von Effektor-Leukozyten aus dem peripheren Blut in interstitielle Gewebe wird in Teilen von chemotaktischen Zytokinen (Chemokinen) und ihren Rezeptoren kontrolliert. Diesen Schritt zu blockieren stellt ein wichtiges Instrument der Kontrolle einer Entzündungsreaktion dar.

Das proinflammatorische Chemokin CCL5/RANTES ist ein chemotaktisches Agens das über die CCR1-, CCR3- und CCR5-Rezeptoren von „Gedächtnis“-CD4+ T-Zellen, Monozyten und Eosinophile wirkt. Es wird von vielen Gewebetypen im Laufe einer Entzündungsreaktion produziert. Die CCR1- und CCR5-Aktivierung konnte als wichtiger Faktor für die Entstehung von akuten Abstoßungsreaktionen mittels *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten identifiziert werden.

Durch metRANTES, dem um ein Methionin verlängerten CCL5-Protein welches einen potenten CCR1 und CCR5 Rezeptor-Antagonisten darstellt, konnte eine Abstoßungsreaktion effektiv reduziert und in Kombination mit anderen Substanzen fast völlig unterdrückt werden. Weitere Modifizierungen am metRANTES-Protein verändern die für CCL5 charakteristische Multimerisierung und seine GAG-Bindungskapazität.

Das „protein engineering“ genannte Verbinden eines Proteins mit einem GPI-Anker bietet die Möglichkeit, durch Reintegration in die Oberflächenmembranen unterschiedlicher Gewebe, Proteine an definierte Lokalisationen zu bringen. Dort können sie, dank der Fähigkeit, sich in die Membranen anderer Zellen wieder einzufügen und die ursprüngliche Funktion wieder anzunehmen (Premkumar, Fukuoka et al. 2001; Djafarzadeh, Mojaat et al. 2004), längere Zeit als soluble Chemokine verbleiben.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche CCL5-Analoga, sowie ein virales Chemokin-Analogon, um eine GPI-kodierende Sequenz erweitert und in einen Expressionsvektor subkloniert. Mittels Transformation wurden sie in Chinese Hamster Ovarial-Zellen (CHO-Zellen) exprimiert. Ihre Expression an der Zelloberfläche konnte dank der FACS-Analyse ermittelt werden und in einem gleichen Schritt wurde die Fähigkeit verschiedener anti-RANTES Antikörper, an die N-terminal veränderten Proteine zu binden, analysiert.

Diese membranverankerten Proteine wurden in höchstmöglicher Konzentration aus der Einheitsmembran extrahiert und in einem weiteren Schritt durch unterschiedliche

Chromatographieverfahren isoliert. Dabei wurde die Heparin-Chromatographie gefolgt von einer Size-exclusion Chromatographie als Methode mit der besten Reinheit und Ausbeute identifiziert. Zuletzt wurden die gereinigten, GPI-verbundenen CCL5-Analoga mit „einfachen“ CHO-Zellen, sowie humanen mikrovaskulären Endothelzellen inkubiert und ihre Reintegration an der Zelloberfläche bewiesen.

Die in dieser Arbeit hergestellten GPI-gebundenen RANTES-Antagonisten eröffnen die Möglichkeit, in weiteren in-vitro, sowie in-vivo Versuchen, die biologische Aktivität dieses Chemokins gezielt zu blockieren oder (in einem analogen Verfahren) zu verstärken. Dadurch kann die Bedeutung des RANTES-Proteins in der Transplantatabstoßung, sowie in weiteren Entzündungsreaktionen herausgearbeitet werden. Durch Perfusion des Organs vor der Transplantation mit dem GPI-verbundenen Chemokin-basierenden Antagonisten, erhofft man sich die Integration des GPI-Ankers in die mikrovaskuläre Endothelialzellmembran und somit die Präsentation des Antagonisten für die zirkulierenden Leukozyten. Ein solches Vorgehen könnte dem Gefäßsystem während der kritischen ersten Tage nach der Transplantation Schutz bieten und somit signifikant die akute vaskuläre Verletzung, die mit einer Verschlechterung der Überlebensprognose verbunden ist, vermindern (Notohamiprodjo, Djafarzadeh et al. 2005).

III EINLEITUNG

Entzündungsprozesse gehören zu den zentralen Schutzmechanismen des Körpers. Sie haben eine essentielle Funktion bei der Abwehr von Krankheitserregern, entarteten Zellen und Fremdkörpern. Andererseits spielen sie auch eine Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen, bei denen eine fehlgeleitete Entzündungsreaktion das eigentliche Krankheitsbild hervorruft.

Bei jeder Entzündung findet ein in vielen komplexen Schritten ablaufender Vorgang statt. Dieser wird zunächst ausgelöst durch spezifische oder unspezifische Reize, wie das Vorhandensein von Krankheitserregern, ihrer spezifischen bakteriellen oder viralen Produkte, oder der Erkennung körperfremder oder entarteter Zellen durch das Immunsystem. Über Produktion verschiedener Mediatoren durch ortsständige oder einwandernde Zellen kommt es zur chemotaktischer Anlockung spezifischer Effektorzellen aus dem peripheren Blut. Durch Mediatoren wird die Expression verschiedener Oberflächenantigene, wie Integrine oder VCAMs, am Endothel und auf den Effektorzellen angeregt, was zu Anheftung und Extravasation dieser Zellen, und schließlich zur Aktivierung der speziellen Funktionen dieser Zellen führt. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei der Regulation der Immunantwort durch ein komplexes Netzwerk von Zytokinen zu. Diese können in verschiedene Stadien auf unterschiedlichen Ebenen immunregulatorisch, d.h. aktivierend, supprimierend oder modulierend eingreifen.

Chemokine

Chemotaktische Zytokine („Chemokine“) wurden zuerst identifiziert, da sie die Migration von verschiedenen Zelltypen lymphoiden Ursprungs zu induzieren vermochten (Seegerer, Nelson et al. 2000; Zlotnik and Yoshie 2000). In der Folge konnte gezeigt werden, dass sie sowohl bei der Rekrutierung, Aktivierung und Effektorfunktion von Leukozyten, als auch in der Hämatopoese, Angiogenese und adaptiven Immunität eine gewichtige Rolle spielen (Nelson and Krensky 2001). Bis heute wurden mehr als 40 Chemokine und 21 Chemokin-Rezeptoren identifiziert (Nelson and Krensky 2001; Murphy 2002), bei z.Z. noch ausstehender Charakterisierung weiterer Kandidaten.

Alle Chemokine sind durch besondere Strukturmerkmale gekennzeichnet. Von besonderer Bedeutung sind hier vier allen Familienmitgliedern gemeinsame Cysteinreste. Je nach Position der ersten zwei Cysteine werden die Chemokine in die Untergruppen der C, CC, CXC, und CX₃C Chemokine eingeteilt. X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinen in der Primärstruktur dieser Proteine. CXC-Chemokine oder α -Chemokine attrahieren in erster Linie neutrophile Granulozyten. Zu dieser Familie gehören SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) und IL-8. Die β -Chemokine der CC-Gruppe, deren bekannteste Vertreter RANTES und MCP-1 sind, wirken dagegen chemoattraktiv auf Monozyten und T-Lymphozyten. Die Vertreter der kleineren Gruppen der C- und CX₃C-Chemokine (Lymphotactin- α und - β , bzw. Fractalkine) wirken auf NK-Zellen und respektive auf Lymphozyten/Monozyten.

Chemokine können des Weiteren nach Funktion und Expressionsmuster eingeteilt werden (Zlotnik and Yoshie 2000; Murphy 2002). Einige Chemokine spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle inflammatorischer Prozesse, andere wiederum sind am regulären Transport von Leukozyten durch primäre und sekundäre Lymphorgane beteiligt (Campbell and Butcher 2000; Rot and von Andrian 2004). Während die „inflammatorischen“ Chemokine über proinflammatorische Stimuli reguliert werden und die angeborenen und adaptiven Immunantworten dirigieren, geht man davon aus, dass die „homöostatischen“ Chemokine „konstitutiv“ exprimiert werden (Zlotnik and Yoshie 2000; Murphy 2002).

Das Chemokin CCL5/RANTES

CCL5/RANTES (ein Akronym für *Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*) gehört der CC-Gruppe der Chemokine an. Es besitzt 68 Aminosäuren und ist mit einem isoelektrischen Punkt von pH 9,5 stark basisch. Es besitzt ein Molekulargewicht von 7,847 kDa (Nelson, Pattison, Krensky, in: (Mire-Sluis and Thorpe 1998)) und tendiert stark dazu, ähnlich wie auch andere Chemokine (MIP-1 α und MIP-1 β), *in vivo*, hochmolekulare Aggregate zu bilden (Skelton, Aspiras et al. 1995; Appay, Brown et al. 1999). Zwei Disulfidbrücken zwischen den vier konservierten Cysteinresten verleihen dem Protein die für Chemokine typische Sekundärstruktur. Der erste Cysteinrest (AS 10) wird mit dem Dritten (AS 34)

verknüpft, der zweite Cysteinrest (AS 11) mit dem Vierten (AS 50). Die Sekundärstruktur von CCL5 ist in Abb. 1 dargestellt.

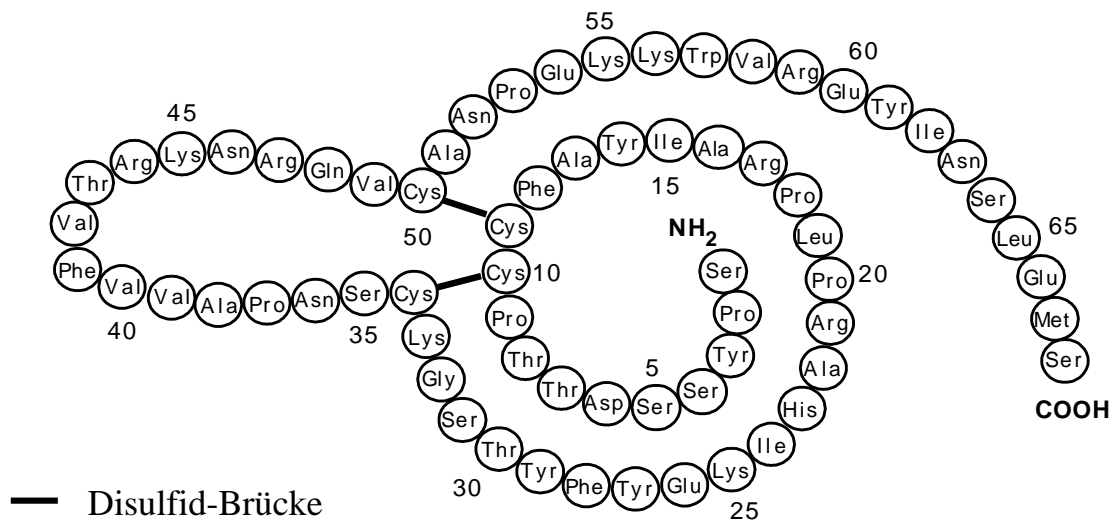


Abbildung 1: Aminosäure-Sequenz und Sekundärstruktur des RANTES Proteins nach Abspaltung der Signalsequenz. Die Sekundärstruktur des Proteins entsteht durch Disulfid-Brücken zwischen den vier konservierten Cysteinresten der CC-Chemokine. Der erste Cysteinrest (AS 10) wird mit dem Dritten (AS 34) verknüpft, bzw. der Zweite (AS 11) mit dem Vierten (AS 50). Entnommen aus dem Kapitel „The Chemokine RANTES“, in „Cytokines“; Handbuch der „Immunopharmacology Series“, Academic Press, 1998.

Czaplewski et al. konnten zeigen, dass der Austausch von Glutamat an Position 26 oder 66 mit einer ungeladenen Aminosäure diese Tendenz hochmolekular zu aggregieren fast vollständig aufheben konnte (Czaplewski, McKeating et al. 1999). In einer weiteren Charakterisierung dieser Mutanten wurde für RANTES-E26A eine Tetramerisierung und für RANTES-E66S eine Dimerisierung beschrieben (Appay, Brown et al. 1999; Baltus, Weber et al. 2003; Weber and Koenen 2006).

Die N-terminale Region der Chemokine spielt eine herausragende Rolle in der Rezeptor-Liganden-Interaktion und kann die biologischen Eigenschaften dramatisch verändern. So führt die Addition eines Methionins am Amino-Ende des CCL5 Proteins (met-RANTES) zur Umwandlung in einen hochpotenten Antagonisten der Rezeptoren CCR1 und CCR5 (Proudfoot, Power et al. 1996; Simmons, Clapham et al. 1997; Proudfoot, Buser et al. 1999). Dieser Antagonismus von Met-RANTES konnte in diversen *in-vitro* und *in-vivo* Studien an Maus- und Ratten-Modellen demonstriert werden (Grone, Weber et al. 1999; Culley, Pennycook et al. 2006; Kucuk, Sozuer et al. 2006; Mueller, Mahmoud et al. 2006; Ajuebor, Wondimu et al. 2007; Longden,

Cooke et al. 2008). Eine Interaktion mit dem CCR3-Rezeptor wurde in Nagetieren nicht beschrieben.

Ähnlich kann eine um nur 2 Aminosäuren verkürzte Form (RANTES 3-68) nach Bindung an die Rezeptoren CCR3 und CCR1 keine intrazelluläre Calcium-Mobilisierung mehr auslösen und zeigt eine stark reduzierte chemotaktische Wirkung gegenüber Monozyten (Van Damme, Struyf et al. 1999; Lim, Burns et al. 2005).

Der Austausch von drei basischen mit drei ungeladenen Aminosäuren auf Position 44-47 (von RANTES-⁴⁴RKNR⁴⁷ zu RANTES-⁴⁴AANA⁴⁷) bewirkt eine starke Reduktion der Affinität von RANTES an Glukosaminoglykane (GAGs) wie z.B. Heparin (Proudfoot, Fritchley et al. 2001; Shaw, Johnson et al. 2004). Des Weiteren wurde eine 80fache Reduktion der Affinität für den CCR1-Rezeptor beschrieben, wengleich die Bindung an CCR5 nicht alteriert wurde.

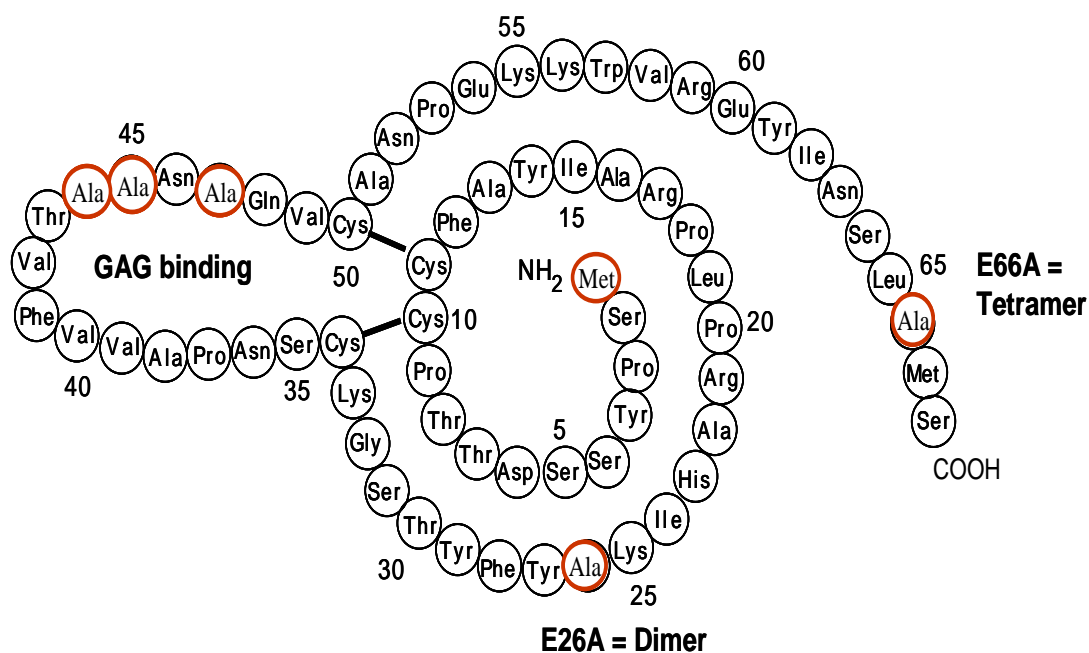


Abbildung 2: Modifizierungen von RANTES zu Met-RANTES, dem dimerisierenden E26A-RANTES, dem tetramerisierenden E66A-RANTES und dem an der GAG-bindenden Domäne modifizierten RANTES

Chemokin-Rezeptoren

Die Wirkung von Chemokinen wird durch die Interaktion mit Chemokin-Rezeptoren vermittelt, deren Nomenklatur analog zu den Chemokinen in CC-, CXC-, C- und CX₃C -Gruppen unterteilt ist. Diese Chemokin-Rezeptoren gehören der Gruppe von

außerhalb der Nomenklatur stehenden Duffy- und D6-Rezeptoren. Die Chemokin-gelenkte Leukozytenmigration scheint somit in einem komplexen Milieu zu geschehen, wo verschiedene chemotaktische Signale zeitgleich oder nacheinander unterschiedliche Rezeptoren triggern. Innerhalb dieser komplexen Umwelt, in der Rezeptoraktivierung und –desensitierung nebeneinander erfolgen, muss die auswandernde Zelle einer Hierarchie von Signalen folgen, um die Stelle der Entzündung zu erreichen (Campbell, Foxman et al. 1997; Hancock, Gao et al. 2000; Segerer, Nelson et al. 2000).

Chemokine und Chemokinrezeptoren in der Transplantat-Abstoßung

Die akute Abstoßung eines Transplantats wird durch Allogen-abhängige und -unabhängige Faktoren ausgelöst und ist durch eine starke Infiltration des Transplantats mit mononukleären Zellen, v.a. Monozyten/Makrophagen, T-Zellen und wenigen Eosinophilen gekennzeichnet (Valente and Alexander 1998; Nelson and Krensky 2001). Nach einer Organtransplantation kommt es, aufgrund der ischämischen Periode und verstärkt durch die Reperfusion des Organs, zu mikrovaskulären Stressreaktionen mit Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und Hochregulation von Adhäsionsmolekülen. Diese führen zu einem vermehrten „trafficking“ von Leukozyten in diese mikrovaskuläre Region (Ambrosio and Tritto 1999; Souza, Bertini et al. 2004). Diese frühe Phase der Gewebsinflammation ist determinierend für die chronische Transplantatabstoßung (Morita, Miura et al. 2001). Daher scheinen therapeutische Strategien, die frühe Gewebeschäden vermeiden, einen signifikanten Einfluss auf das Transplantatüberleben zu haben.

Da CCL5 als mRNA und Protein während der akuten Transplantatabstoßung in großen Mengen nachweisbar ist (Pattison, Nelson et al. 1994; Nadeau, Azuma et al. 1995; Nagano, Nadeau et al. 1997), galt dieses Chemokin in seiner Wechselwirkung mit den CCR1- und CCR5-Rezeptoren als potentieller Faktor für die Entstehung einer Abstoßungsreaktion. Auf diesen Beobachtungen basierend, wurde ein Modell für die Rolle von CCR1 und CCR5 in der renalen Transplantatabstoßung vorgeschlagen (Wiedermann, Kowald et al. 1993; Pattison, Nelson et al. 1994; Nibbs, Wylie et al. 1997). In einer frühen Phase der Abstoßung entzündet sich das Endothel und Thrombozyten degranulieren und lassen dabei das CCL5-Protein frei, welches an der Endotheloberfläche bindet. Des Weiteren produzieren die entzündeten renalen Tubuli

und das Endothel weitere Chemokine. Das akkumulierte, an der Oberfläche bindende Chemokin gibt den zirkulierenden Leukozyten ein direktionales Signal, während sie am Endothel „entlangrollen“ (Butcher 1991; Springer 1994; Butcher and Picker 1996). Die Chemokinrezeptoren der Leukozyten erkennen das oberflächengebundene Protein und regulieren die Integrin-Produktion hoch. Daraufhin gehen sie eine feste Adhäsion mit der endothelialen Oberfläche ein und durchlaufen die Diapedese und Extravasation. Diese Beobachtungen konnten im Ratten-Tiermodell bestätigt werden (Grone, Weber et al. 1999). In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit des CCR1- und CCR5-Antagonisten Met-RANTES nach Nierentransplantation getestet. Met-RANTES trägt ein zusätzliches Methionin am Amino-Terminus und ist ein potenter RANTES Rezeptor-Antagonist (Proudfoot, Power et al. 1996). Durch Met-RANTES konnte eine Abstoßungsreaktion effektiv reduziert, und in Kombination mit anderen Immunsuppressiva fast völlig unterdrückt werden. Grone et al. zeigten, daß Met-RANTES die Adhäsion von Monozyten an aktivierte Endothelien verhindert, und so die Einwanderung von Monozyten ins Gewebe unterbunden wird (Grone, Weber et al. 1999).

Fischereder et al. untersuchten den Einfluss des CCR5-Rezeptor-Status des Transplantatempfängers auf die mittlere Transplantatüberlebenszeit (Fischereder, Luckow et al. 2001), anhand der im Weiteren beschriebenen, nicht seltenen Deletion (20% Heterozygote und 1% Homozygote in der Mitteleuropäischen Bevölkerung) von 32bp im CCR5-Rezeptor (CCR5 Δ 32), welche einen nicht-funktionellen Rezeptor bedingt. Es zeigte sich ein deutlich verlängertes insgesamtes Transplantatüberleben in der Gruppe der homozygot Δ 32-deletierten Individuen, in der es während des Beobachtungszeitraumes nur einen einzigen Transplantatverlust gab. Dies verdeutlicht die essentielle Rolle der Interaktion von CCR5 und seinem Hauptliganden, CCL5, beim Prozess der Transplantatabstoßung (Fischereder, Luckow et al. 2001).

Die Schlüsselrolle, die Chemokine und ihre Rezeptoren bei Abstoßungsreaktionen, dank ihrer Fähigkeit, die Migration von Leukozyten zu regulieren, spielen, eröffnet auch neue therapeutische Ansätze. Eine entsprechende Modulation der Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktion oder auch ein Eingreifen auf Stufe der Expression von Chemokinen könnten helfen, die akuten oder auch chronisch-entzündlichen

Vorgänge, die zur Destruktion des transplantierten Organs führen, beherrschbarer zu machen.

Biologische Eigenschaften von Chemokinen

Die herausragende Eigenschaft, die Chemokine besitzen, ist die Fähigkeit, Chemotaxis auszulösen. Dabei kommt es zu einer gerichteten Bewegung von Zellen zum Ort der höchsten Konzentration des Chemokins hin. Leukozyten können dabei sogar auf Konzentrationsunterschiede von nur 1% reagieren (Springer 1994). Wie schon erwähnt, wirken CCR1- und CCR5-Rezeptoragonisten stark chemoattraktiv auf T-Zellen, darunter vor allem CD45RO⁺-Zellen, und Monozyten (Schall, Bacon et al. 1990; Taub, Lloyd et al. 1993). Aber auch NK-Zellen, Eosinophile und Basophile können rekrutiert werden (Kameyoshi, Dorschner et al. 1992; Alam, Stafford et al. 1993; Maghazachi, al-Aoukaty et al. 1994; Taub, Sayers et al. 1995). Die Extravasation von Leukozyten wird durch ein komplexes Zusammenspiel von löslichen Mediatoren und Oberflächenmolekülen, die vom Gefäßendothel und den Leukozyten exprimiert werden, ermöglicht und des Weiteren durch Interaktionen der auswandernden Zelle und der extrazellulären Matrix bestimmt. Wird das Endothelium aktiviert, so exprimiert es Selektine an seiner Oberfläche. Diese gehen mit den mucin-ähnlichen Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) der stimulierten Leukozyten eine lockere Bindung ein, so dass diese im Kapillarstrom entlang der Gefäßwand ins Rollen geraten (Maghazachi, al-Aoukaty et al. 1994).

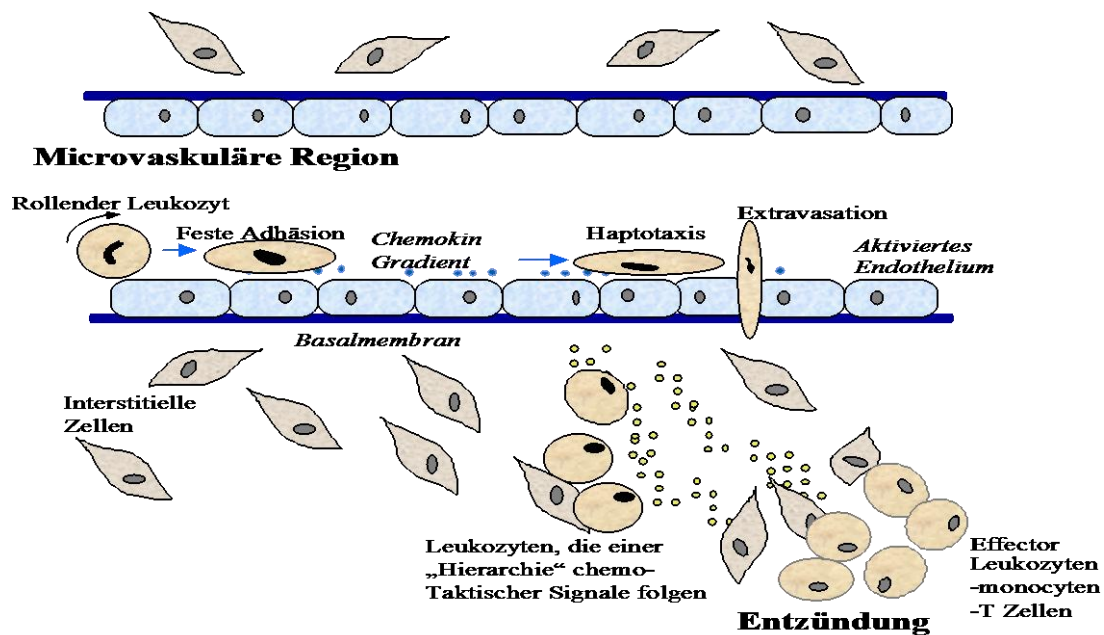


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vorgangs der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe. Chemokine (schwarze oder graue Punkte) bewirken die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Nach der transendothelialen Migration folgen die Leukozyten einer Serie oder Hierarchie chemotaktischer Signale zum Ort der Entzündung. Abbildung modifiziert nach Nelson und Krensky, 1998.

Kommt es nun in einem zweiten Schritt zu einer Interaktion zwischen den - auf dem rollenden Leukozyten exprimierten - Chemokinrezeptoren mit Chemokinen, die an der Zelloberfläche an Glukosaminoglykane (GAGs) gebunden sind oder auf Endothelzellen exprimiert werden, so erfolgt eine Konformationsänderung heterodimerer Integrine. Dies ermöglicht dem aktivierten Leukozyten eine feste Adhäsion an das Endothel und eine nachfolgende Transmigration (Maghazachi, al-Aoukaty et al. 1994; von Hundelshausen, Weber et al. 2001).

Die Chemokine werden hierbei von aktivierten Thrombozyten freigesetzt oder von endothelialelem und subendothelialelem Gewebe produziert. Über elektrostatische Wechselwirkung binden sie an spezifische Glukosaminoglykane an der Endotheloberfläche (Witt and Lander 1994). Dadurch entsteht ein oberflächengebundener Chemokingradient, entlang welchem die Zellen ihre Migration vollziehen können. Diese oberflächengebundene Migration wird auch Haptotaxis bezeichnet (Alam, Stafford et al. 1993). Die ständigen Chemokin-Rezeptor-Interaktionen selektieren also eine Subpopulation der vorbeireisenden Leukozyten und führen sie durch Chemotaxis und Haptotaxis zum "Ort des Geschehens". Abhängig vom jeweiligen Chemokin und dessen Konzentration werden

Integrine auf der Oberfläche einer bestimmten Leukozytenpopulation exprimiert, welche dadurch fest am Endothel adhärert und schließlich auswandert.

Ein beträchtliches Hindernis für die Leukozyten auf dem Weg ins Gewebe stellt die, im gesunden Gewebe nur schwer zu durchdringende, Basalmembran dar. Eine Gruppe von proteolytischen Enzymen, die diese Membran zu durchwandern helfen, sind die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Sie degradieren Kollagen und andere Substanzen der extrazellulären Matrix (Xia, Leppert et al. 1996; Segerer, Nelson et al. 2000). Chemokinrezeptoren, wie z.B. CCR5, vermitteln dabei die Produktion und Sekretion von MMP-2 und MMP-9 in den infiltrierenden T-Zellen (Xia, Leppert et al. 1996) und Monozyten (Grone, Weber et al. 1999) und erleichtern dadurch den Weg ins Gewebe. Chemokinrezeptoren besitzen somit auch bei diesem zweiten Schritt der Extravasation des Leukozyten eine wichtige regulierende Aufgabe. Zuletzt findet sich im entzündeten Gewebe selbst eine Vielzahl chemotaktischer Agenzien, die eine „Hierarchie“ chemotaktischer Signale bilden. Die eingewanderte Zelle muss sich nun an mehreren Gradienten orientieren, um schließlich den Entzündungsherd zu erreichen (Campbell, Foxman et al. 1997; Nelson and Krensky 1998).

Glykoinositol-Phospholipid-Anker

Die posttranslational gebundenen Glykoinositol Phospholipide (GPIs) dienen einer Vielzahl von Oberflächenproteinen als Membran-Anker (Englund 1993) (McConville and Ferguson 1993). GPIs wurden Mitte der 70er Jahre zuerst postuliert und in Kombination mit einer steigenden Anzahl von Proteinen gefunden. Die genaue Struktur und der Ablauf der Biosynthese konnten jedoch erst 15 Jahre später aufgeklärt werden. Die große Anzahl der bis heute beschriebenen GPI-gebundenen Proteine weist eine große Diversität auf und ist weder nach Funktion, noch nach Struktur einer Gruppe zuzuordnen. Auf der anderen Seite ist der Membran-Anker bei all diesen Proteinen annähernd strukturgleich (Walter, Ratnoff et al. 1992), während die konventionellen Polypeptid-Anker sehr unterschiedliche Transmembran-Sequenzen haben können.

Die GPI-Anker bestehen aus einem linearen Glykan - mit einem Phosphoethanolamin (EthN), drei Mannoseeinheiten und einem nicht-azylierten Glukosamin (GlcN) – welches mit einem Inositolphospholipid kovalent verbunden ist (siehe Abb.5). GPIs werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vorproduziert und „en bloc“ an die

primären Translationsprodukte gebunden, die an ihrem C-terminalen Ende eine GPI-Signalsequenz besitzen (Tykocinski, Shu et al. 1988; Moran, Raab et al. 1991; Gerber, Kodukula et al. 1992). Die GPI-veränderten Produkte werden daraufhin im ER und Golgi-Apparat glykosyliert und an die Zelloberfläche geführt (Medof, Nagarajan et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass GPI-gebundene Proteine eine große laterale Mobilität innerhalb der äußeren Einheitsmembran der Zelle besitzen (Ishihara, Hou et al. 1987; Bulow, Overath et al. 1988). Den bisherigen Daten zufolge, werden GPI-Anker von allen Eukarionten benutzt.

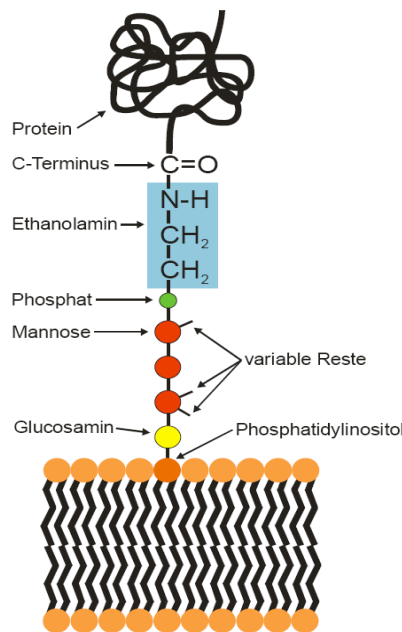


Abbildung 5: Struktur vom Glykoinositolphospholipid-Anker. Es besteht aus einem Ethanolamin, drei Mannosemolekülen und einem nicht-azetylierten Glucosamin, welches mit einem Phosphatidylinositol verbunden ist. Ein verzweigendes Ethanolamin hängt in diesem Beispiel an Man1 (nach Medof et al., 1996)

Eine der herausragenden Eigenschaften von GPI-verankerten Proteinen ist die Fähigkeit, sich nach Extraktion aus Zellen in die Plasmamembranen anderer Zellen zu reintegrieren und dort ihre ursprüngliche Funktion wieder anzunehmen (Premkumar, Fukuoka et al. 2001; Djafarzadeh, Mojaat et al. 2004). Studien mit GPI-gekoppelten Oberflächenproteinen (Bulow, Overath et al. 1988), Enzymen (Horta, Ramalho-Pinto et al. 1991), Rezeptoren (Brodsky, Jane et al. 1994; Nagarajan, Anderson et al. 1995), Histokompatibilitäts-Antigenen (Huang, Getty et al. 1994), Adhäsionsmolekülen (Selvaraj, Dustin et al. 1987), sowie anderen immunologisch relevanten Proteinen (Zhang, Crise et al. 1991) haben in allen Fällen gezeigt, dass die reinkorporierten

Moleküle ihre nativen extrazellulären Interaktionsmöglichkeiten in vollem Maße wieder finden konnten. In einer Studie konnte in-vivo sogar der intermembranäre Transfer GPI-verankerter Proteine von Erythrozyten auf Endothelzellen gezeigt werden (Kooyman, Byrne et al. 1995).

Da, wie schon oben beschrieben, das Signal, welches zur Verankerung eines Proteins mit einem GPI führt, im C-terminalen Ende eines entstehenden Polypeptids beinhaltet ist, kann im Prinzip jedes Protein in ein GPI-gekoppeltes Derivat verwandelt werden. Dabei reicht es, die endogene 3'-Endsequenz durch die eines ursprünglich GPI-verankerten Proteins wie zum Beispiel das ko-stimulatorische LFA-3 zu ersetzen (Djafarzadeh, Noessner et al. 2006). Nachdem dieses Derivat exprimiert und gereinigt wurde, kann es nun dank des Lipidankers in die Oberfläche anderer Zellen integriert werden. Diese Technologie, die man „protein engineering“ oder auch „cell painting“ nennt, bietet eine Alternative zum konventionellen Gentransfer um Zelloberflächen zu modifizieren und bietet in einer Reihe von Situationen praktische Vorteile (Medof, Nagarajan et al. 1996). Auch hat sich der Fokus auf klinische Applikationen, wie z.B. die Entwicklung von zellulären Tumorstoffen und anderer Immuntherapien, verlagert (Medof, Nagarajan et al. 1996). So wurden Studien an GPI-veränderten Zytokinen (Weber, Groger et al. 1994), Haupthistokompatibilität-Komplex (MHC) Klasse I – Proteinen (Huang, Getty et al. 1994) und ko-stimulatorischen Proteinen (McHugh, Ahmed et al. 1995; Brunschwig, Fayen et al. 1999) wie z.B. B7-1 und B7-2 durchgeführt. Es erscheint die Produktion und Nutzung von einer virtuell unbegrenzten Anzahl von weiteren Molekülen möglich.

Chemokine und die Th-1/Th-2 Zellen Immunantwort

Wie oben schon erwähnt, ist die Expression von Chemokinen und ihrer Rezeptoren verbunden mit der Entstehung einer adaptiven Immunantwort (Murphy, Robert et al. 2000; Sallusto, Mackay et al. 2000; Sozzani, Allavena et al. 2000). Von T-Helferzellen geleitete Th1- und Th2-Antworten repräsentieren dabei die zwei Extreme in einem breiten Spektrum der möglichen Immunreaktionen. Die Th1 Untergruppe führt zu einer starken zellulären Aktion, die durch Pathogene stimuliert wird, die Zellen infiltrieren. Dies stimuliert eine Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten und eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ. Die Th2 Antwort hingegen bewirkt eine Reaktion vom humoralen Typ mit Aktivierung von B-

Lymphozyten und Produktion von Antikörpern. Des Weiteren besitzen Th2-typische Zytokine eine negative Rückkoppelung auf die proinflammatorischen, Th1-spezifischen Antwortmuster und unterdrücken diese (Murphy, Robert et al. 2000; Sallusto, Mackay et al. 2000; Sozzani, Allavena et al. 2000). Das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Antwort kann somit zu einer verstärkten Immunantwort oder zu einer Toleranzentwicklung führen (Nelson and Krensky 2001).

Auch bei der Expression von Chemokinrezeptoren scheinen sich unterschiedliche Muster zwischen Zellpopulationen einer Th1- und einer Th2-gesteuerten Reaktion zu finden. Erstere scheinen erhöhte CXCR3 und CCR5 Expressionen zu besitzen, während Th2-Zellen vermehrt CCR4 und CCR8 an ihrer Oberfläche präsentieren (Murphy, Robert et al. 2000; Sallusto, Mackay et al. 2000; Sozzani, Allavena et al. 2000).

Das virale Makrophagen Inflammatorische Protein-II

Wie einleitend schon bemerkt wurde, dienen Chemokine und ihre Rezeptoren unter anderem der Regulation einer Immunreaktion zur Abwehr von Krankheitserregern. Jedoch hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass eine Anzahl von Viren dieses System „korrumpiert“ haben und es als Instrument nutzen, um diverse Schritte ihrer eigenen Ausbreitung zu erleichtern (Murphy 2001). Unter anderem kodiert das mit dem Kaposi-Sarkom assoziierte Humane Herpesvirus 8 (HHV8) molekulare Imitate des humanen Makrophagen Inflammatorischen Protein 1α (MIP 1α /CCL3), des Interleukins 6 (IL-6) und von zwei Chemokin-Rezeptoren (Moore, Boshoff et al. 1996; Nicholas, Ruvolo et al. 1997; Murphy 2001). Das virale Makrophagen Inflammatorische Protein (vMIP-II) bindet an die Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 und CXCR4 und ist ein potenter Antagonist der Chemokine CCL3, CCL4, CCL5 und CX3CL1 (Kledal, Rosenkilde et al. 1997). Die Autoren dieser Arbeit suggerieren, dass vMIP-II dadurch eine Leukozyteninfiltration als Antwort auf eine virale Infektion verhindern könnte. Auch ist vMIP-II ein Agonist am Chemokin-Rezeptor CCR8, der auf Th2-Zellen gefunden wird. Von Hundelshausen et al. konnten unter Flussbedingungen zeigen, dass vMIP-II die feste Adhäsion von Monozyten und Th1-Zellen an aktiviertes Endothelium inhibiert, gleichzeitig aber die Adhäsion von Eosinophilen und Th2-Zellen induziert (von Hundelshausen, Weber et al. 2001). Auch hier wird das besprochene Th1-/Th2-Zellen Gleichgewicht von einer

zytotoxischen Antwort in Richtung einer humoralen Reaktion verschoben. Diese Daten konnten von Chen et al. in einem *in-vivo* Glomerulonephritismodell in der Ratte verifiziert werden. Der Einsatz von vMIP-II konnte sowohl die glomeruläre Infiltration von zytotoxischen CD8⁺-Zellen signifikant reduzieren als auch die in der Kontrollgruppe gemessene Proteinurie stark vermindern (Chen, Bacon et al. 1998). Somit stellt vMIP-II ein potentes anti-inflammatorisches Agens dar und kann als immunmodulatorische Substanz eingesetzt werden (Murphy 2001).

Fragestellung und experimentelle Strategie

Die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 sind mit ihrem proinflammatorischen Liganden CCL5/RANTES für verschiedene Entzündungsvorgänge mitverantwortlich. Durch Antagonisierung der CCR1/CCR5-vermittelten endothelialen Transmigration von aktivierten Leukozyten können Krankheitsverläufe, wie z.B. die akute Transplantatabstoßung reduziert und abgemildert werden (Grone, Weber et al. 1999). Als potente Antagonisten kommen das am N-Terminus um ein Methionin modifizierte CCL5-Chemokin oder aber die viral kodierte Chemokin-Analoga in Betracht. Um in den erwähnten Transplantationsmodellen einen biologischen Effekt zu beobachten, mussten die CCL5-basierten Antagonisten täglich in hohen Konzentrationen über längere Zeiträume verabreicht werden. Dies könnte ein Problem darstellen, da hohe Plasmaproteinspiegel des Chemokinrezeptorantagonisten potentielle Nebenwirkungen auf andere Organsysteme haben könnten. Um auf diese Probleme einzugehen wurde ein Ansatz gewählt, in dem die CCL5-basierten Antagonisten selektiv an die endotheliale Oberfläche des Zielorgans angebracht werden. Dies konnte durch die Fusion des N-terminal um ein Methionin verlängerten CCL5-Proteins mit einem Glykoinositol-Phospholipid-Anker (GPI) erreicht werden. Das Verbinden eines Proteins mit einem GPI-Anker bietet die Möglichkeit, durch Reinkorporation in die Oberflächenmembranen unterschiedlicher Gewebe, Proteine an definierte Lokalisationen zu bringen und dort verbleiben zu lassen. GPI-gekoppelte Chemokin-Rezeptorantagonisten können dabei eine neue Rolle in der Immunmodulation der endothelialen Transmigration spielen, da Endothelien zum Einen leicht zugängliche Gewebe sind (z.B. durch Pre-perfusion eines Transplantatorgans) und gleichzeitig auch der natürliche Wirkungsort chemotaktischer Zytokine ist.

Chemokine wie z.B. CCL5 und das Chemokinanalogon metRANTES besitzen eine hohe Affinität zu den an den endothelialen Oberflächen befindlichen Glukosaminoglykanen (GAGs), sowie die Tendenz untereinander Multimere zu bilden. Diese Eigenschaften können nach Verbinden mit einem GPI-Anker dessen Reintegration in die Einheitsmembran kompromittieren. Es besteht jedoch die Möglichkeit, mittels Mutation einzelner Aminosäuren, diese Affinitäten zu kontrollieren (mittels Dimerisierung, Tetramerisierung, Reduktion der GAG-Affinität) ohne die antagonisierenden Eigenschaften zu verlieren.

Diese Arbeit hat zum Ziel, mit GPI-verankerten Chemokin-Rezeptorantagonisten eine neue Generation von Immunmodulatoren zu generieren. Dabei wird das methionierte CCL5 oder das virale MIP-II um eine GPI-kodierende Sequenz erweitert. Diese Chemokin-Analoga werden nun in einen Expressionsvektor subkloniert und mittels Transformation in Chinese Hamster Ovarial-Zellen (CHO-Zellen) exprimiert. Gleichzeitig werden die oben erwähnten Mutationen durchgeführt, um eine korrekte Reintegration in die endotheliale Oberflächenmembran zu garantieren. Diese membranverankerten Proteine werden in einem weiteren Schritt aus der Einheitsmembran extrahiert und daraufhin mittels verschiedener Chromatographieverfahren isoliert. Nachdem die Reinkorporation in fremde Zelloberflächen gesichert ist, sollen die GPI-gekoppelten Proteine für immunmodulatorische Studien zur Verfügung stehen und die akute T-Zellen- und Macrophagen-medierte Entzündungsreaktion in der akuten Transplantatabstossung über einen längeren Zeitraum reduziert werden.

IV MATERIAL UND METHODEN:

Vorbemerkung

Grundlegende molekularbiologische Methoden wie Präzipitation und Quantifizierung von Nukleinsäuren, Analyse von DNA-Fragmenten durch Auftrennung in einem Agarosegel und einfache Klonierungen werden in dieser Arbeit nicht beschrieben. Die entsprechenden Arbeitsvorschriften wurden entnommen aus „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“ (Sambrook, Fritsch et al. 1989) und dem Kapitel „Linker Scanning Mutagenesis“ aus „Mutagenesis: A Practical Approach“ (Präparation von DNA im Mini- und Midimaßstab) (McPherson 1991). In diesem Kapitel werden nur die Methoden beschrieben, die für die Durchführung dieser Arbeit von besonderer Bedeutung waren.

Materialien und Puffer

Für alle Experimente wurde ausschließlich Wasser verwendet, das in einer Filteranlage der Firma Millipore (Milli-QUF Plus) durch Umkehrosiose gereinigt wurde. Für alle enzymatischen Reaktionen wurde das Wasser zudem autoklaviert.

Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Alle verwendeten Enzyme, mit Ausnahme der DNase I (Worthington, Freehold, NJ) wurden von den Firmen Boehringer Mannheim und New England Biolabs bezogen. Puffer- und Inkubationsbedingungen sowie Restriktionsschnittstellen, können den entsprechenden Katalogen entnommen werden.

Bakterienstämme und Agarplatten für deren Kultur

DH5 α (Stratagene)

dieser Bakterienstamm wurde zur Vermehrung aller Plasmide verwendet

LB-Agarplatten

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Bactoagar (Difco)	15 g
H ₂ O ^{MP} ad 1 l	

LB-Ampicillin-Agarplatten

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Bactoagar (Difco)	15 g
Ampicillin	100 µg/ml
H ₂ O ^{MP} ad 1 l	

Kulturmedien

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O ^{MP} ad 1 l	

LB-Ampicillin-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Ampicillin	100 µg/ml
H ₂ O ^{MP} ad 1 l	

CHO-Medium

- Komplettes αMEM-Medium (GIBCO BRL, Life Technologies)
- 10% dialysiertes, Hitze-Inaktiviertes Fetales Rinderserum (FCS) (GIBCO BRL, Life Technologies)
- 1% HT-Supplement (GIBCO BRL, Life Technologies)

CHO-Selektions-Medium

- Komplettes αMEM-Medium (Life Technologies)
- 10% dialysiertes, Hitze-Inaktiviertes Fetales Rinderserum (FCS) (Life Technologies)
- kein Supplement

Hybridomzell-Medium

- RPMI 1640 mit Glutamax-1 (GIBCO BRL, Life Technologies)
- 2,5% Fetalem Rinderserum (FCS) (GIBCO BRL, Life Technologies)
- 200 U/ml Penicillin (Penicillin/Streptomycin Stammlösung, Firma PAA)
- 200 U/ml Streptomycin (siehe oben, Firma PAA)
- 20mM HEPES

Allgemeine Puffer

TE-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA, pH 8	1 mM

10x TBE-Puffer:

Tris-Borat	0,09 mM
EDTA	10 mM
Borsäure	2 mM

6x Gel-Ladepuffer für DNA-haltige Lösungen:

- 0,25 % Bromphenolblau
- 0,25 % Xylencyanol
- 30% Glycerol (in H₂O)

Hypotonischer Zell-Lyse-Puffer:

Tris	5 mM
MgCl	2 mM
EDTA	0,1 mM
und die Proteinasen-Inhibitoren:	
PMSF (Roche)	1 mM
Aprotinin (Roche)	2µg/ml
Leupeptin (Sigma)	2µg/ml
Pepstatin A (Roche), pH 7,4	1µg/ml

Protein-Extraktionspuffer:

NaCl	40 mM
Triton-X 100	1%
Tris	10 mM
EDTA	5 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	2µg/ml
Leupeptin	2µg/ml
Pepstatin A, pH 7,4	1µg/ml

Tris/HCl: (Firma Roth # 4855.3)

HEPES: 1 M (Firma Invitrogen (GIBCO) # 15630-056)

PBS-Puffer: (Firma PAA # H15-002)

Puffer für Immunoaffinitäts-chromatographie

- **Äquilibriumspuffer:**
TrisCl, pH 8,0 0,01 M
NaCl 0,15 M
NaN₃ 0,025%
Triton X-100 1%
- **Waschpuffer 1:**
TrisCl, pH 8,0 0,05 M
Triton X-100 0,1%
NaCl 0,5 M
- **Waschpuffer 2:**
TrisCl, pH 9,0 0,05 M
Triton X-100 0,1%
NaCl 0,5 M
- **Elutionspuffer:**
Triethanolamin, pH 11,5 0,05 M
Triton X-100 0,1%
NaCl 0,15 M
- **TSA-(Tris/Saline/Azide-)Puffer:**
TrisCl, pH 8,0 0,01 M
NaCl 0,15 M
NaN₃ 0,025%

Puffer für Ion-exchange-chromatographie

- **Puffer A:**
Na-Acetat 50 mM
Triton X-100 0,1%
NaCl 0 mM
- **Puffer B:**
Na-Acetat 50 mM
Triton X-100 0,1%
NaCl 2000 mM

Puffer für Heparin-chromatographie

- **Puffer A:**
NaCl 100 mM
NaPi 10 mM
Triton X-100 0,1%
- **Puffer B:**

NaCl	3000 mM
NaPi	10 mM
Triton X-100	0,1%

Puffer für Gelfiltrations-chromatographie

- **Puffer A:**
1x PBS
0,025% Triton X-100

Puffer für Silberfärbung:

- **Inkubationspuffer:**
NaThiosulfat 0,25 g
NaAcetat 5,15 g
Glutaraldehyd (20%) 0,65 ml
Ethanol 37,5 ml

H₂O^{MP} ad 125 ml

- **Silberlösung:**
Silbernitrat 125 mg
Formaldehyd (37%) 75 µl

H₂O^{MP} ad 125 ml

- **Entwicklerlösung:**
NaCarbonat 3,125 g
Formaldehyd 37,5 µl

H₂O^{MP} ad 125 ml

- **Stopplösung:**
EDTA (Titriplex III)

29,2g

H₂O^{MP} ad 2l

Herstellung von Plasmiden und Mutationen

Mutationen in RANTES wurden mittels Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Protokoll hergestellt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Verwendung von zwei Primern, welche bereits die gewünschte Mutation enthalten, für eine PCR von dem Vorlageplasmid. Für sämtliche Mutationen wurde ein pUC-19 (Yanisch-Perron, Vieira et al. 1985) Vektor benutzt.

Ein hRANTES-kodierendes DNA-Fragment (freundlicherweise überlassen von Prof. A. Krensky, Stanford, USA) wurde mittels PCR amplifiziert. Der *sense*-Primer wurde folgendermaßen zusammengestellt: nach fünf zufällig gewählten Nukleotiden folgt eine EcoRI-kodierende Restriktionsschnittstelle (unterstrichen). Zuletzt die 16 ersten, hRANTES-kodierenden Nukleotide, beginnend mit dem Startkodon (ATG): 5'-CGGCGGAATTCATGAAGGTCTCCGCGG-3'. Der *antisense*-Primer entsprach 15 Nukleotiden GPI-Sequenz, da das gesamte Konstrukt mittels überlappender PCR hergestellt wurde, gefolgt von einer XbaI-Schnittstelle (unterstrichen) und 22 Nukleotiden hRantes-3'-Sequenz, wobei das Stoppkodon deletiert wurde, damit die GPI-Sequenz exprimiert werden kann: 5'-TGGGATACAGGTTGTTCTAGAGCTCATCTCCAAAGAGTTGATG-3'. Ein DNA-Fragment, welches das Signal für die GPI-Verankerung von LAF-3 kodiert, wurde durch PCR vermehrt und in den pEF-DHFR-Vektor (Mack, Riethmuller et al. 1995) kloniert. Der *sense*-Primer beinhaltet eine XbaI Restriktions- Schnittstelle (unterstrichen): 5'-TCTTTGGAGATGAGCTCTAGAACAACCTGTATCCCAAGCAG-3'. Der *antisense*-Primer kodiert für eine SalI - Schnittstelle (unterstrichen): 5'-TCCGCGGCCGCTATTGGCCGACGTCGACTCATAATACATTCATATACAGCACAA TACATGTTG-3'. Um dem, durch Koppelung an das GPI in der Membran verankerten, Chemokin seine ursprüngliche flexible Struktur zu bewahren, wurden zwischen GPI-Anker und dem maturen Chemokin sechs kleine, unpolare Aminosäuren (Prolin, Glycin, Alanin) eingefügt. Diese geben dem Protein die nötige Flexibilität und Distanz zur Einheitsmembran, um eine unveränderte Struktur und Funktion zu gewähren.

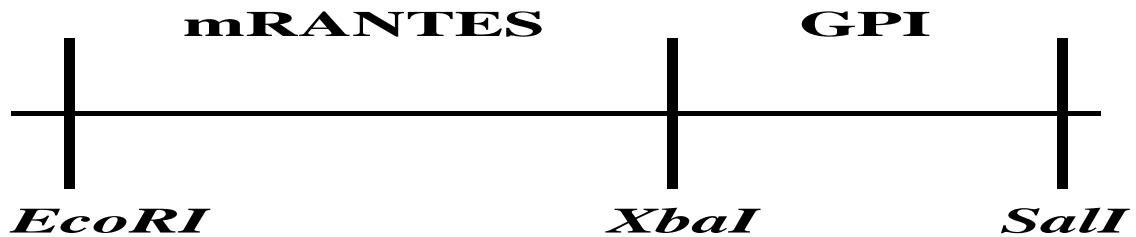


Abbildung 6: Skizze des inserts. *RANTES-Mutation und GPI-kodierende Sequenz werden zur vereinfachten Handhabbarkeit durch eine XbaI-Site getrennt.*

Um vereinfachtes Subklonieren weiterer RANTES-Mutationen zu ermöglichen, wurde zwischen hRANTES und dem GPI-Anker eine XbaI-Schnittstelle eingefügt. So wurden die unterschiedlichen RANTES-Konstrukte nach einem gleich bleibenden Schema in den pEF-Vektor integriert (siehe Skizze).

Zunächst wurde das hRANTES-GPI mit dem Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) zum methionierten met-RANTES-GPI mutiert. Die weiteren Mutationen zum dimerisierenden hRANTES-E26S-GPI, zum tetramerisierenden hRANTES-E66S-GPI und zum hRANTES-44AANA47-GPI, welches keine GAG-bindende Domäne mehr besitzt, wurden in met-RANTES-GPI durchgeführt.

Das virale Makrophagen Inhibitorische Protein II (vMIP-II) wurde als Insert eines pUC-Vektors freundlicherweise von Prof. Gröne, DKFZ, Heidelberg überlassen. Da die Xba-I Schnittstelle methyliert war, wurde zunächst eine Amplifizierung mittels PCR durchgeführt, bevor das vMIP-II nach Protokoll in den pEF-Vektor inseriert wurde. Im antisense Primer wurde auch das Stoppkodon mutiert, damit, ähnlich wie beim RANTES-GPI, die GPI-kodierende Sequenz exprimiert werden kann.

Ansatz für die Mutations-PCR:

- 50 ng Plasmid-DNA (pUC19-RANTES)
- 125 ng *sense*-Primer (Firma Metabion)
- 125 ng *antisense*-Primer (Firma Metabion)
- 1 µl dNTP mix (Stratagene Kit)
- H₂O ad 50 µl
- 1 µl PfuTurbo Polymerase (Stratagene Kit)

PCR-Reaktion (GeneAmp PCR-System9700):

1 Zyklus:

- 5 Minuten: 95°C
- 30 Zyklen:
- 30 Sekunden: 95°C
 - 1 Minute: 58°C
 - 1 Minuten: 72°C

Nun wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 1 µl DpnI für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Da dieses Enzym spezifisch methylierte DNA schneidet, wird das PCR-Produkt, das nicht methyliert ist, nicht angegriffen. Somit wird allein das spezifisch mutierte PCR-Produkt nicht degradiert.

1 µl dieser DpnI-behandelten DNA wurden durch einen 45sekündigen Hitzeschock mit 42°C in 50 µl Epicuran Coli XL1-Blue Superkompetente Zellen (Stratagene Kit) transformiert. Durch Zugabe von 0.5 ml NZY Medium wurden Startkulturen angelegt, welche für 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert wurden. Anschließend wurde das gesamte Volumen auf LB-Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert. Nach Übernachtinkubation im Brutschrank waren etwa 100 Kolonien angewachsen, von denen 6 einzelne ausgewählt wurden und jeweils in 2ml LB-Medium angezüchtet wurden. Mit dem MiniPrep (Fa. Qiagen) wurde die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers aus diesen Kulturen isoliert. Die Präparationen wurden diagnostisch verdaut und sowohl verdaut als auch unverdaut auf einem 0,6% Agarosegel analysiert. Drei Plasmidpräparationen wurden ausgewählt und sequenziert (s. u.). In der Regel zeigten alle drei, mindestens jedoch zwei der sequenzierten Plasmidpräparationen die korrekte Basensequenz.

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch „cycle sequencing“ nach der von Sanger beschriebenen Kettenabbruchreaktion (Sanger, Nicklen et al. 1977). Bei dem verwendeten „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Medigenomix) erfolgt die Markierung der PCR-Produkte durch Einbau von Dideoxynukleotiden, die jeweils einen von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe tragen. Durch die Markierung der Abbrucholigonucleotide lassen sich so einem einzigen PCR-Ansatz alle vier Abbrucholigonucleotide analysieren. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden für die jeweilige Mutante von der Fa. Metabion synthetisiert.

Die Sequenzierung wurde von der Fa. Medigenomix durchgeführt.

Ligation

Zunächst wurden das pUC-PCR-Produkt und der pEF-DHFR-Vektor jeweils mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall (Fa. Böhlinger Mannheim) verdaut und auf einem 1%-Agarosegel analysiert (Laufzeit 90-120 Minuten, 90V).

Ansatz:

- 2-3µg DNA
- 1µl EcoRI
- 1µl Sall
- 2µl H-Puffer
- H₂O ad 25µl

Die zutreffenden Produkte aus der CCL5-Mutation und der pEF-Vektor wurden aus dem Gel mit Hilfe des QiaQuick Gel-extraction Kit (Fa. Qiagen) extrahiert und zur Ligation mit einer DNA-Ligase (T4-Ligase, Fa. Biolabs, 400 U/µl) zusammengeführt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Ansatz:

- 15ng pEF-DHFR-Vektor
- 40-50ng Mutations-DNA
- 1µl DNA-Ligase
- 1µl Puffer
- H₂O ad 10µl

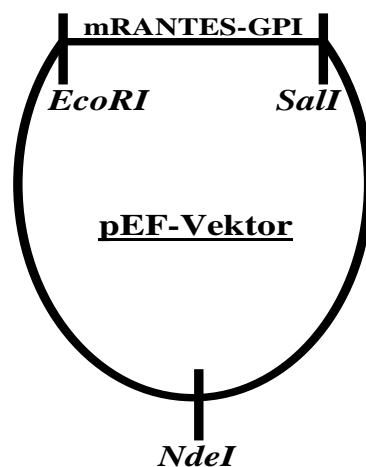


Abbildung 7: Skizze des pEF-Vektors mit insert. Gezeigt sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *Sall* für das insert (hier met-RANTES-GPI), sowie *NdeI*, welches zum Linearisieren vor der Transfektion benutzt wird.

Nach diagnostischem Verdau durch die Restriktionsenzyme EcoRI und SalI konnten die jeweiligen Plasmid-inserts mit der GPI-gekoppelten RANTES-Mutante wie oben beschrieben aus dem Agarosegel extrahiert und einer erneuten Sequenzierung zugeführt werden. Erwies sich diese als richtig, wurde das pEF-metRANTES-GPI Plasmid mit dem Restriktionsenzym NdeI geschnitten. Dieses besitzt im pEF-DHFR-Vektor nur eine Schnittstelle in einem nicht relevanten Bereich, so dass das Plasmid in linearisierter Form vorliegt und nun in die eukaryontischen Chinese Hamster Ovary (CHO-) Zellen transfiziert werden kann.

1/10 des jeweiligen, oben beschriebenen Ligationsansatzes wurden in DH5 α -Bakterien transformiert, in 2ml LB-Medium bei 37°C inkubiert und mittels „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) präpariert. Hiervon wurden 100 μ l Bakteriensuspension entnommen und 900 μ l Glycerin (aus einer 10%igen Glycerin-Stammlösung) entnommen und bei -80°C aufbewahrt.

Zelllinien

Für die Transfektion, Kultur und Expression der RANTES-GPI-Konstrukte wurden DHFR-defiziente Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO/dhfr-) (ATCC, Rockville, MD, USA No. CRL.9096) benutzt.

Transfektion

Die Transfektion mit DEAE-Dextran ist zwar eine sehr schonende Methode, ist aber nur für transiente Transfektionen geeignet. Für die stabile Transfektion von GPI-gekoppelten Chemokin-Analoga wurde die Elektroporationsmethode bevorzugt. Da die Zellen sich bei der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollen, wurden sie am Vortag 1:1,5 umgesetzt. Ca. $5 \cdot 10^6$ CHO-Zellen werden aus den Kulturflaschen abgelöst und in PBS aufgenommen. Das linearisierte Plasmid, in H₂O gelöst, wird zu den CHO-Zellen hinzugefügt und 10min lang auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgt in Küvetten mit 4mm Elektrodenabstand (Firma peqLab) in einem Gerät der Firma Bio-Rad (Gene Pulser mit Capacitance Extender). Nach weiterer Inkubation auf Eis, werden die transfizierten Zellen zum Wachstum in den Brutschrank zurückgelegt.

Protokoll:

- 30 μ g des linearisierten Plasmids in 50 μ l H₂O lösen

- $5 \cdot 10^6$ CHO-Zellen aus den Kulturflaschen ablösen, zweimal mit PBS waschen und wieder abzentrifugieren
- Das Pellet in 300-400 μ l PBS aufnehmen und mit dem Plasmid 10min lang auf Eis inkubieren
- Das Inkubat in 4mm Elektroporationsküvetten (Fa. PeqLab) bei RT, 960 μ F und 260V transfizieren
- Die transfizierten Zellen 10min auf Eis inkubieren
- Zellen in 2ml CHO-Medium aus Küvette spülen und auf eine 75cm² Flasche mit 20ml CHO-Medium (mit HT-Supplement) geben
- Zur Kultur in den Brutschrank legen

Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel mit Selektionsmedium (ohne Zusatz von HT-Supplement). Da die CHO/dhfr- Zellen auf HT-Supplement angewiesen sind, können nur noch die Zellen proliferieren, die das DHFR-Gen mit dem pUF-Vektor transfiziert bekommen haben. Dadurch wird eine Selektion und ein Absterben aller nicht-transfizierten Zellen erreicht.

Zellkultur

CHO-Zellen

DHFR-defiziente Chinese Hamster Ovary (CHO-) Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA) wurden in komplettem α MEM-Medium angereichert mit 10% dialysiertem, Hitze-Inaktiviertem Fetalen Rinderserum (FCS) und 1% HT-Supplement kultiviert.

Die Kultur fand in 20ml Medium auf 75cm²-Flaschen in einem Heraeus Brutschrank unter Standardbedingungen (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) statt. Etwa 2-mal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und mit 1,5mM EDTA pro 75cm²-Flasche inkubiert, um die Zellen abzulösen. Nach 3-5 Minuten wurden 10ml Medium hinzugefügt und anschließend die Zellen in ein 50ml Falcon-Gefäß überführt und für 3 bei 110 g (Minifuge T, Heraeus). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in der entsprechenden Verdünnung auf 75cm²-Flaschen oder 500cm²-Triple-flasks ausgesät.

Hybridom-Zellen

Zur Herstellung von anti-RANTES Antikörpern wurden Antikörper-Produzierende Hybridom-Zellen (persönlicher Bestand PD Dr. Nelson) benutzt. Diese wurden zunächst unter oben genannten Standardbedingungen in 75cm²-Flaschen, schließlich in 2,8l großen Rollerflaschen, kultiviert. Die Zellen wurden kultiviert in RPMI 1640 mit Glutamax-1 angereichert mit 2,5% Fetalem Rinderserum (FCS), 200 U/ml Penicillin, 200 U/ml Streptomycin und 20mM HEPES. Hybridom-Zellen haben zur Eigenschaft, den Antikörper in das umgebende Medium zu sezernieren. Somit kann der Antikörper aus den Überständen gesammelt und gereinigt werden.

FACS-Analyse

Die Expression der GPI-gekoppelten RANTES-Mutanten und viralen Chemokin-Analoga wurden auf der Zelloberfläche der CHO-Zellen mittels „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS-) Analyse kontrolliert. Das Prinzip beruht dabei auf der Inkubation der GPI-Proteine exprimierenden Zellen mit einem primären Antikörper, der gegen dieses Protein gerichtet ist. Nach mehrfachem Waschen wird im nächsten Schritt ein fluoreszenzmarkierter, den primären Antikörper bindender sekundärer Antikörper hinzugefügt. Nun kann die Oberflächenexpression der GPI-verankerten Proteine in einem Fluss-Zytometer (FACS Calibur, Becton, Dickinson and Company, USA) mit Hilfe der CellQuest Analyse-Software analysiert und mit einer Kontrollgruppe verglichen werden.

Protokoll:

- Transfizierte CHO-Zellen mit 1,5mM EDTA (Biochrom A, in PBS) lösen
- Primären Antikörper hinzufügen (IgG_{2κ} anti-RANTES-Antikörper (VL-1 bis VL-4, 5µg/ml), anti- ν MIP-II-Antikörper (5µg/ml purified Goat IgG, AF601, R&D), oder IgG_{2κ}-Isotyp-Antikörper (Sigma-Aldrich, 5µg/ml))
- 60 Minuten auf Eis inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Sekundären Antikörper hinzufügen (FITC-konjugierter Esel-Anti-Maus IgG-Antikörper (DAKO A/S, Dänemark))
- 30-45 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Im Fluss-Zytometer (FACS Calibur) zählen und mit Hilfe der CellQuest Analyse-Software analysieren

Protein-Extraktion

Um die membrangebundenen GPI-Proteine isolieren zu können, müssen die CHO-Zellen zuerst lysiert werden und in einem zweiten Schritt die GPI-gekoppelten Proteine aus den Membranen extrahiert werden. Die geernteten Zellen werden in einem 5fachen Volumen hypotonischen Lyse-Puffers (5mM Tris, 2mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, sowie der Proteinase-Inhibitoren-Cocktail) eine Stunde lang inkubiert. Der hypotonische Puffer bricht die Membranstruktur der Zellen auf. Anschließend wird 20 Minuten zentrifugiert. Die im pellet befindlichen Membranen werden im Folgenden mit einem Extraktionspuffer (40mM NaCl, 1% Triton X-100, 10mM Tris, 5mM EDTA und Proteinase-Inhibitoren) inkubiert. Das darin befindliche Detergens Triton X-100 löst die GPI-Proteine aus den Membranen heraus und bildet mit ihnen micellare Strukturen. Nach weiteren 20 Minuten Zentrifugation findet sich das solubilisierte GPI-gebundene Protein im Überstand und lässt sich weiteren Reinigungsschritten zuführen.

Protokoll:

- Geerntete Zellen in hypotonischem Puffer (5faches Volumen) 60 Minuten bei 4°C inkubieren
- 20 Minuten bei 4°C und 11.000g zentrifugieren
- Pellet in Extraktionspuffer 60 Minuten bei 4°C inkubieren
- 20 Minuten bei 4°C und 11.000g zentrifugieren
- Überstand enthält solubilisiertes, GPI-gebundenes Protein

Protein-Isolierung

FPLC

Alle Chromatographieschritte zur Aufreinigung von Proteinen wurden an einem Äkta - Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) Gerät der Firma Amersham Biotech ausgeführt. Dieses misst UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm, pH und Salzkonzentration und kann somit präzise anzeigen, in welchen der gesammelten Fraktionen Protein eluiert wurde. Die Logbücher der unterschiedlichen Reinigungsprotokolle werden aus Platzgründen nicht aufgeführt und sind den Anleitungen des Herstellers zu entnehmen.



Abbildung 8: Äkta - Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) der Firma Amersham Biotech. *Alle Chromatographieschritte zur Aufreinigung von Proteinen wurden an einem Äkta - FPLC Gerät der Firma Amersham Biotech ausgeführt.*

Da diese Methode der Proteinaufreinigung zu Beginn der Arbeit in unserer Arbeitsgruppe noch nicht etabliert war, nahm ich vom 4.-6. Februar 2002 am von der Firma Amersham Biosciences organisierten theoretischen und praktischen Training teil.

Immunoaffinitäts-Chromatographie

Ak-Produktion und Reinigung

Die Kultur fand wie oben beschrieben statt. Um jedoch größere Mengen produzieren zu können wurden 900cm² Rollerflaschen bei einer konstanten Umdrehung von 20/min benutzt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert und steril filtriert. Im nächsten Schritt wurde dieser mit Waschpuffer vermischt und auf eine Protein G Sepharose-Säule, die mit ebendiesem Puffer äquilibriert worden war, aufgetragen. Nach ausführlichem Waschen wurde der gereinigte Antikörper mit fallendem pH eluiert. Dies fand in der Regel bei pH-Werten zwischen 2,5 und 2,8 statt. Da zu niedrige pH-Werte den Antikörper beschädigen können, wurde dem aufgereinigten Antikörper noch 0,1M Glycin-

HCl hinzugeben. Zuletzt wurde dieser mittels Western-blot und Silberfärbung auf ausreichende Aufreinigung getestet.

Protokoll:

- Zellen bei 20,000 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand abpipettieren, steril filtrieren und in 2-3 Volumina Waschpuffer 1 (0,1M Na-acetat, pH 5,0) diluieren
- Auf äquilibrierte Protein G Sepharose-Säule (UltraLink, Pierce) auftragen
- 10 Säulenvolumina Waschpuffer 1
- 5 Säulenvolumina Waschpuffer 2 (0,1M Na-acetat, pH 4,0)
- 5 Säulenvolumina Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5)
- 5 Säulenvolumina Regenerationspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 1,5)
- 5 Säulenvolumina Äquilibrierungspuffer (0,1 M Na-acetat, pH 5,0)

Immunoaffinitäts-Sepharose

Der aufgereinigte anti-RANTES-Antikörper VL-3 vom Typ IgG_{2κ} wurde nun hergenommen, um eine Immunoaffinitäts-Chromatographiesäule herzustellen. Dazu wurde CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) benutzt und nach Protokoll mit dem Antikörper kovalent verbunden.

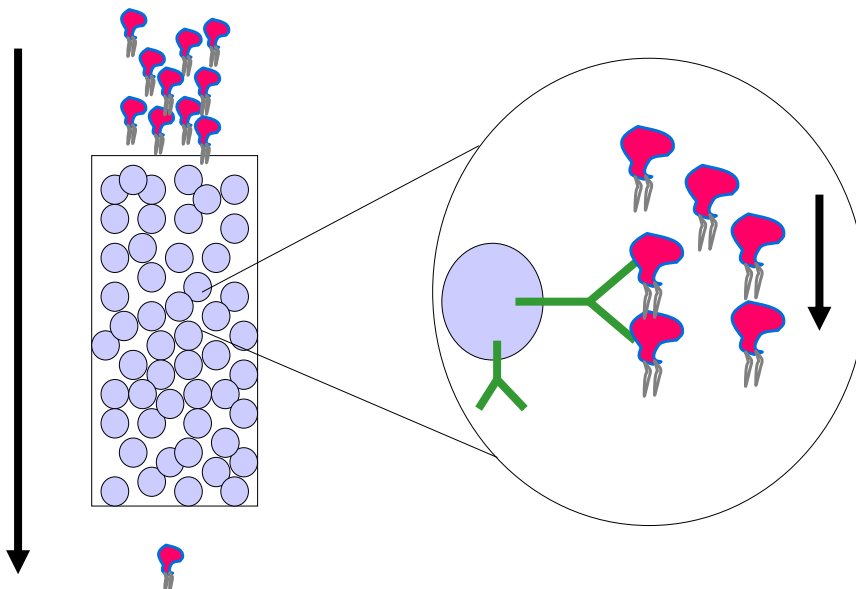


Abbildung 9: Prinzip der Immunoaffinität. An Sepharose-“Beads“ gebundene Antikörper binden spezifisch das zu reinigende Protein, welches nach ausführlichem Waschen bei hohem pH eluiert wird.

Verkürzend beschrieben wird die CNBr-Sepharose in 1mM HCl suspendiert und dadurch aktiviert. Die Säure wird nach kurzer Inkubation wieder abgesaugt. Der Antikörper sollte in

0,1M NaHCO₃, pH 8,3 gelöst sein und wird mit der aktivierten Sepharose gemischt und inkubiert. Überschüssige aktive Gruppen der Sepharose werden mit 0,1M Tris-Cl, pH 8,0 zwei Stunden lang inkubiert und anschließend in alternierenden Schritten mit 0,1M NaAcetat, pH 4,0 und 0,1M Tris-Cl, pH 8,0 gewaschen. Schließlich wurde die Sepharose in eine Säule (HR5/5, Amersham) gegossen.

Unspezifische Kontrollsepharose

Um unspezifische Bindungen einiger Proteine an die Immunoaffinitäts-Sepharose mit anti-RANTES-Antikörper, und damit Verunreinigungen, zu verhindern, wurde eine Säule mit einem Maus-Isotyp-Antikörper hergestellt. Hierzu wurde wie schon oben beschrieben CNBr-aktivierte Sepharose kovalent mit drei Milligramm eines Maus-Isotyp-IgG2b Antikörpers (Southern Biotech, USA) verbunden und nach Protokoll gewaschen und in eine Säule (HR5/5, Amersham) gegossen.

Reinigungsprotokoll

Verkürzend beschrieben werden in diesem recht komplizierten Reinigungsverfahren (Current Protocols in Molecular Biology, 10.11.2) die Kontrollsepharose und die spezifische Immunoaffinitäts-Sepharose in Reihe geschaltet (siehe Abbildung 10) und mit Puffern unterschiedlichen pH und Salzgehalts gewaschen.

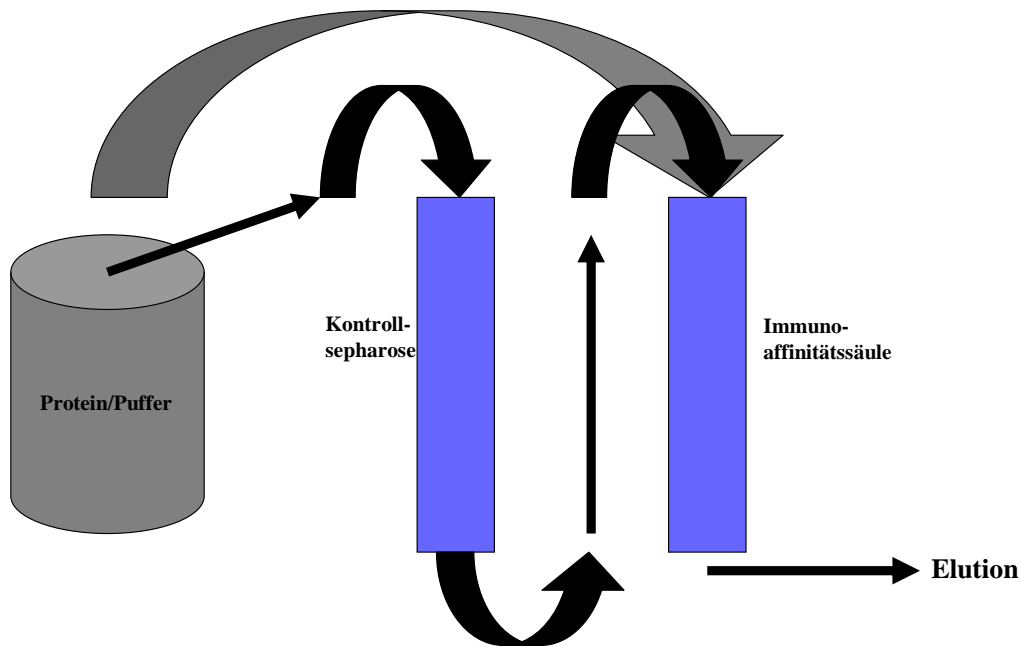


Abbildung 10: Das Protein wird über eine unspezifische Kontrollsepharose geführt und im zweiten Schritt auf die Immunoaffinitätssäule (schwarze Pfeile). Zur Elution wird der Puffer direkt auf die spezifische Affinitätssäule gelenkt (grauer Pfeil).

Das GPI-gekoppelte Protein wird anschließend appliziert und geht eine spezifische Bindung mit dem an die Sepharose gebundenen Antikörper ein. Nachdem die Kontrollsäule abgehängt wurde, werden nun in unterschiedlichen Waschschrritten (mit Puffern mit steigendem pH- und Salzgehalt) unspezifische Bindungen an den Antikörper gelöst und die Elution des GPI-gekoppelten CCL5-Analogons bei einem pH von 11,5 provoziert. Zuletzt werden beide Säulen mit einem Azid-haltigen Puffer regeneriert und gelagert.

Kationen-Austauscher

Chemische Eigenschaften

Ein Ionen-Austauscher besteht aus einer nicht löslichen Matrix, an der geladene Gruppen kovalent gebunden wurden. Die Art der an der Matrix kovalent gebundenen Gruppe bestimmt die Art und Stärke des Ionenaustauschers. Die Gesamtanzahl und Verfügbarkeit der Gruppen determiniert dessen Kapazität. Die geladenen Gruppen sind mit mobilen Gegen-Ionen assoziiert. Diese Gegen-Ionen können reversibel mit anderen Ionen derselben Ladung ausgetauscht werden, ohne die Matrix zu verändern. Die Ladung des Gegen-Ions gibt der Austauschersäule ihren Namen. Kationen-Austauscher sind somit negativ geladene Matrices

und haben positiv geladene Gegen-Ionen. Der in dieser Versuchsreihe benutzte Kationen-Austauscher besitzt als funktionelle Gruppe einen Sulphopropyl- (SP-) Rest (-O-CH₂-CHOH-CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂SO₃⁻), welche einen starken Kationen-Austauscher bildet. Stärke bedeutet hier nicht die Bindungsstärke, sondern das Ausmaß der Variabilität der Ionisation bei unterschiedlichem pH. Ein starker Ionenaustauscher ist über eine weite pH-Spanne vollständig ionisiert. Dies bedeutet, dass die Bindungskapazität bei hohem oder niedrigem pH nicht schwankt und somit die Interaktion zwischen Austauschersepharose und dem Protein kontrolliert und einfach abläuft. Um die Bindungen der Proteine an den Ionenaustauscher zu lösen, wird im Elutionsschritt die Salzkonzentration des Puffers in einem linearen Gradienten langsam angehoben und somit die Bindungsaffinität aufgefächert.

Für die Kationenaustauscher-Chromatographie wurde eine SP HP Sepharose Säule (Säulenvolumen: 0,96ml) der Firma Amersham Biosciences benutzt und mit einem salzarmen Puffer äquilibriert (Puffer A, 0mM NaCl). Nach Auftragen des extrahierten Proteingemischs wurde zur Elution die Salzkonzentration linear auf bis zu 2000mM NaCl innerhalb von zwanzig Säulenvolumina angehoben. Zuletzt wird die Säule mit dem NaCl-freien Puffer re-äquilibriert und somit regeneriert. Das Reinigungsprotokoll wurde analog zum oben genannten Immunoaffinitätsverfahren programmiert. Aus Platzgründen wird das Logbuch hier nicht aufgeführt.

Heparin Chromatographie

Chemische Eigenschaften

Heparin gehört zu der Gruppe der Glukosaminoglykane und besteht aus der Aneinanderkettung der Zuckermoleküle D-Glukuronsäure, D-Glukosamin-N,O-Sulfat, L-Iduronsäure-2-Sulfat und D-Glukosamin-N,O-Sulfat. Glukosaminoglykane sind der Kohlenhydratanteil der Proteoglykane, welche wichtiger Bestandteil der Interzellulärschubstanz von Bindegewebe sind. Die starke Hydrophilie der Glukosaminoglykane ist dabei ausschlaggebend für die Bindung von Wasser im Bindegewebe (Junqueira, Carneiro, Schiebler, 1996) und somit für die Diffusion zahlreicher wasserlöslicher Substanzen durch das Bindegewebe. Glukosaminoglykane binden auch über elektrostatische Wechselwirkungen an eine Reihe Proteine. Unter anderem besitzen viele Chemokine eine GAG-bindende Domäne, welche es ihnen erlaubt, an Zelloberflächen und im Interzellulärraum zu binden und

somit einen Konzentrationsgradienten, an dem Zellen entlang migrieren (Haptotaxis), herzustellen.

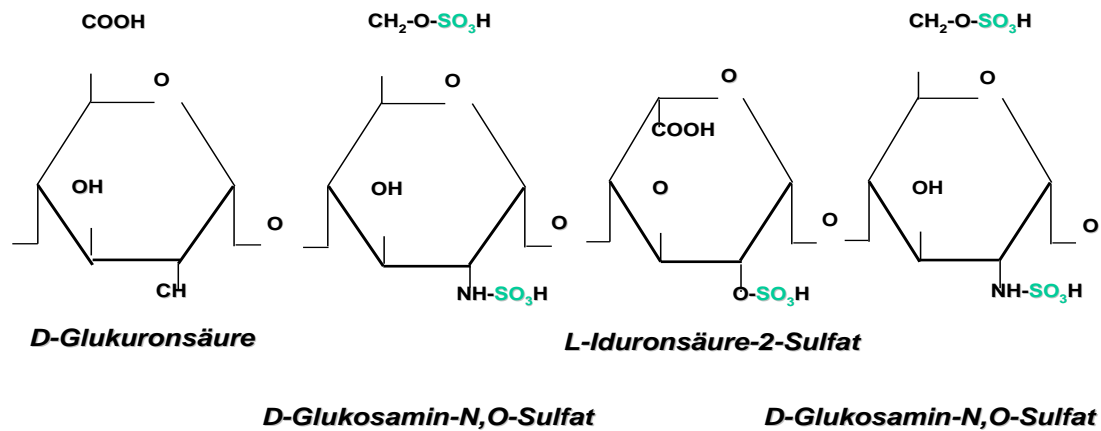


Abbildung 11: Struktur der funktionellen Gruppe einer Heparin-Affinitätssäule.
 Das Heparin besteht aus einer Aneinanderkettung von D-Glucuronsäure, D-Glukosamin-N,O-Sulfat, L-Iduronsäure-2-Sulfat und D-Glukosamin-N,O-Sulfat.

Dank der klinischen Medizin ist Heparin als GAG zu großer Berühmtheit gelangt. In der Tat geht das soluble Heparin eine starke Bindung zum Plasmaprotein Antithrombin III ein und verstärkt dessen inhibitorische Wirkung auf die Gerinnungskaskade, sowie auf das Kallikrein und den "membrane attack complex" des Komplementsystems um ein Vielfaches. Die starke Bindung zu Proteinen mit GAG-bindender Domäne hat man sich zunutze gemacht, um diese von anderen Proteinen nach Chromatographieverfahren zu trennen. Ähnlich wie bei der Ionenaffinitäts-Sepharose besteht die Heparinaffinitäts-Sepharose aus einer nicht löslichen Matrix und einer funktionellen Gruppe (dem namensgebenden Heparin).

Für diesen Chromatographieschritt wurde eine Heparin Sepharose Fast Flow Säule (Amersham Biosciences, Säulenvolumen 1,0ml) verwendet und mit dem Äquilibriumspuffer (100mM NaCl, 10mM NaPi, 0,1% Triton X-100) gewaschen. Wie schon bei der Ionenaustauscher-Chromatographie werden bei Heparinsäulen die Affinitätsbindungen zu den Proteinen mit steigenden Salzkonzentrationen - je nach Bindungsstärke - gelöst. Der lineare Gradient wurde in diesem Fall innerhalb von zwanzig Säulenvolumina auf bis zu 3000mM NaCl angehoben. Zuletzt wird die Säule wieder re-äquilibriert.

Die Programmierung des Reinigungsprotokolls geschah gemäss oben aufgeführtem Schema, so dass auf die Darstellung des Logbuchs verzichtet wird.

Gelfiltrations-Chromatographie

Volumenreduktion

Die in vorangegangenen Schritten aufgereinigten Proteinfraktionen werden "gepoolt" und mit Hilfe des Centricon concentrator Amicon Ultra auf das 10-15fache konzentriert. Dabei wird mittels Zentrifugation das Wasser über eine Membran mit einer Porengröße von 10,000 MWCO (Fa. Millipore, Eschborn) vom übrig bleibenden Protein getrennt. Die zuvor auf einer Heparinsäule gereinigten GPI-verankerten Chemokin-Analoga wurden auf ein Volumen von rund 0,3 ml reduziert.

Chemische Eigenschaften

Das Prinzip der Gelfiltrations-Chromatographie oder "Size-exclusion"-Chromatographie beruht in einer einfachen Auftrennung nach Größe der Moleküle. Die Gelmatrix besteht, wie in Abbildung 12 schematisch dargestellt, aus größeren Gel-Elementen, die eine Vielzahl von kleinen Einhöhungen besitzen. Somit können kleine Moleküle in diese „Inkavationen“ eindringen und dort weitere elektrostatische Bindungen eingehen, während große Elemente daran vorbeifließen. Die Matrix geht somit eine stärkere Bindung mit kleinen Molekülen ein, während größere Proteine schneller durch die Säule hindurchfließen.

So werden die Proteine nach absteigendem Molekulargewicht aufgetrennt. Ein wichtiger Parameter ist dabei die Länge der zu durchlaufenden Gelstrecke, weshalb Gelfiltrationssäulen vorzugsweise in hohe Säulen mit geringem Durchmesser zu gießen sind. Da die Flusseigenschaften über die gesamte Säule sehr regelmäßig und präzise sein müssen um den Trenneffekt zu garantieren, müssen die Säulen fehlerfrei und ohne Luftbläschen gegossen werden. Es bietet sich gerade im Falle der Gelfiltrationssäulen an, auf eine maschinell gegessene, kommerzielle Lösung zurückzugreifen.

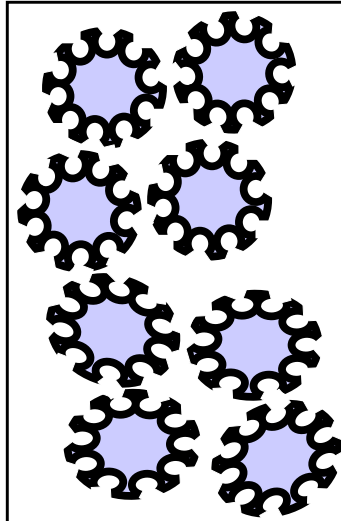


Abbildung 12: Schema der « Size-exclusion-Chromatographie ». Große Moleküle binden nur an die größeren Elementen der Matrix, während kleinere Moleküle in die « Inkavationen » eindringen können und somit intensiver an die Gelmatrix binden.

Zuletzt ist es auch noch von Bedeutung, dass das ganze Proteingemisch gleichzeitig aufgetragen wird. Aus diesem Grund wurde zuvor die oben beschriebene Konzentrierung durchgeführt, um somit das Auftragsvolumen (auf rund 0,3ml) zu reduzieren.

Für die Gelfiltrations-Chromatographie wurde eine Superdex 75 HR 10/30 Säule der Firma Amersham Biosciences (Säulenvolumen: 23,56ml) benutzt. Da die Gelfiltration den letzten Schritt in der Aufreinigung der mutierten, in CHO-Zellen transfizierten und exprimierten, aus der Zellmembran extrahierten und einen ersten Chromatographieschritt durchlaufenden CCL 5-Analoga darstellt, wird für die weitere Verwendung in *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen die Detergens-Konzentration und der Salzgehalt im Äquilibrierpuffer herabgesetzt. Die Säule wurde daher mit einem einfachen, aus PBS und 0,025% Triton X-100 bestehenden, Puffer äquilibriert, bevor das vorgereinigte und konzentrierte Proteingemisch aufgetragen wurde. Das Protein fließt dabei schneller als der Puffer, in dem es gelöst war und wird somit im Äquilibrierpuffer eluiert. Das recht einfache Reinigungsprotokoll, bestehend aus einem Äquilibrierungsschritt, dem Proteinauftrag und einem Waschschrift, und das Logbuch werden hier nicht angeführt.

Dialyse/Pufferwechsel

Für einfache Dialyseschritte wurden die Slide-A-Lyzer® Dialyse-Kassetten der Firma Pierce mit einem Molekularen Cutoff bei 10.000 Da benutzt. Dabei wird die Dialyse-Kassette

zunächst 30 Minuten in Wasser getaucht. Nun wird das Dialysat (bis zu 3 ml) in die Kasette gespritzt und in den Dialyse-Puffer getaucht. Nach zwei Stunden und nach weiteren zwei Stunden wird der Puffer jeweils ausgewechselt. Nach einigen Stunden (meist über Nacht) ist davon auszugehen, dass der Puffer vollständig ausgetauscht wurde.

Ein weiteres Dialyseverfahren, das verwendet wurde und dank seiner einfachen Anwendung und Geschwindigkeit oben beschriebenem Dialyseverfahren in allen Punkten überlegen ist, ist die so genannte "Entsalzungs-" oder Desalting-säule. Ähnlich dem Prinzip der Gelfiltrationssäule geht hierbei die Gelmatrix eine größenabhängige Affinität mit der aufgetragenen Substanz ein. Das Protein fließt dabei schneller als der Puffer, in dem es gelöst war. Die Desalting-Säule wird also zuerst mit dem gewünschten Puffer äquilibriert. Im nächsten Schritt wird das "Dialysat" aufgetragen und die proteinhaltigen Fraktionen gepoolt. Für die Pufferwechsel wurden 5ml große HiTrap Desalting Säulen (Amersham Biosciences) hergenommen. Die Nachteile dieser Methode sind, dass jeweils nur geringe Mengen Protein zur gleichen Zeit verwendet werden können, so dass dieser Schritt bei größeren Volumina wiederholt werden muss. Vergleichbar mit der "klassischen" Membrandialyse sind auch bei der Desaltingsäule ein Volumenanstieg um das rund 1¹/₂ fache zu beobachten. Die Programmierung des Reinigungsprotokolls geschah gemäss oben aufgeführtem Schema. Auf die Darstellung des Logbuchs wird verzichtet.

WesternBlot/Silverstain

Zur Detektion und Kontrolle der gereinigten Proteine wurden sowohl Western Blots als auch Silberfärbungen angefertigt. Dafür wurde zuerst das Protein auf einem SDS-Gel bei 120V der Größe nach aufgetrennt. Es wurden SDS-Gele NuPAGE 4-20% Bis-Tris-Gel der Fa. Invitrogen benutzt. Neben dem Ansatz wurden stets 10µl eines Proteinmarkers (SeeBlue®, Fa. Invitrogen) sowie als Positivkontrolle 100ng gereinigten RANTES-Proteins und als Negativkontrolle 5µl des gleichermaßen GPI-gekoppelten, aus Zellmembranen extrahierten TIMP-1 Proteins (TIMP-GPI) benutzt.

Western Blot

Beim Western Blot wurden die Proteine nun bei niedriger Voltage auf eine Membran (PVDF-Membran, Fa. Invitrogen) transferiert und eine eventuelle Verschmutzung wurde mit einer

Blockier-Lösung verhindert. Die so aufgetragenen Proteine sind nun für spezifische detektierende (Primär-) Antikörper zugänglich. Als Primärantikörper wurden 10µg VL-1 anti-RANTES-Antikörper (IgG_{2κ}) benutzt. Nach mehreren ausführlichen Waschschritten, wurde in einem zweiten Schritt ein Antikörper mit Chemolumineszenz-Label, der sich gegen den primären Antikörper richtet, hinzugegeben. Die chemolumineszent-markierte Stelle kann nun auf Röntgenfilm abgebildet werden. Sämtliche Western Blots wurden mit dem WesternBreeze Chemiluminescent Immunodetektion-Kit (Fa. Invitrogen) nach Protokoll durchgeführt. Es wurden Röntgenfilme der Fa. Kodak verwendet und mit Hilfe des maschinellen Entwicklers CURIX60 der Firma Agfa entwickelt.

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung wird das SDS-Gel über Nacht in einem NaThiosulfat- und NaAcetat-haltigen Puffer inkubiert. Nach ausführlichem Waschen werden Proteinbindungen unspezifisch mit einer Silbernitratlösung über 30 min angefärbt und erneut mit H₂O^{MP} gewaschen. Die Entwicklerlösung, bestehend aus NaCarbonat und Formaldehyd färbt unspezifisch sämtliche Silbernitrat-haltigen Stellen im SDS-Gel. Die Entwicklung kann man nach Belieben mit einer EDTA-Lösung unterbrechen.

Somit kann mit dem Western Blot eine spezifische Immunodetektion des gesuchten Proteins erreicht werden, während die Silberfärbung eines SDS-Gels eine Evaluation des Kontaminationsgrades des gereinigten Proteins erlaubt.

CCL5 ELISA

Um solubles metRANTES zu detektieren wurde ein für humanes CCL5/RANTES-spezifisches ELISA-Kit benutzt. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Der "capture"-Antikörper gegen humanes CCL5 (anti-human CCL5 mAB (840216)), das biotinylierte anti-CCL5 Ziegen-Detektionsantiserum (840217), Streptavidin-HRP (890803) und rhCCL5 protein (840218) wurden von der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden, Germany) erworben.

Proteinmengenbestimmung

Die Konzentrationen aufgereinigter Antikörper wurden nach der Bradford-Methode mit dem „Protein Assay“ der Fa. BioRad ermittelt.

Die zu messenden Proteine wurden auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde mit Bovinem Serumalbumin (BSA) folgende Verdünnungsreihe angesetzt: 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 und 0 µg/ml. Zu 200 µl der diversen Verdünnungen wurden 50 µl der „Protein Assay“-Lösung zugegeben und gemischt. Es folgte eine photometrische Messung bei 600 nm (Beckman Biomek 1000) und die Ermittlung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe der Eichkurve.

In-vitro Versuche

Reinkorporation in CHO-Zellen

Um die Funktionalität der gereinigten Chemokin-Analoga zu testen, gilt es zuerst, die Reinkorporation der (in micellarer Form befindlichen) GPI-gekoppelten Proteine in die Einheitsmembran zu verifizieren. Dazu wurden nicht transfizierte CHO-Zellen (jeweils $2,5 \cdot 10^5$ Zellen) mit unterschiedlichen Konzentrationen met-RANTES-GPI 60 Minuten bei 33°C inkubiert. Nach ausführlichem Waschen wird wie bei der einfachen FACS-Analyse ein primärer anti-RANTES-Antikörper (VL-3) (von Luettichau, Nelson et al. 1996) und ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper hinzugefügt. In einem Fluss-Zytometer (FACS Calibur, Becton, Dickinson and Company, USA) mit Hilfe der CellQuest Analyse-Software wird die Reintegration der GPI-verankerten Proteine in die Oberflächenmembran der "leeren" Zellen analysiert und mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Protokoll:

- Transfizierte CHO-Zellen mit 1,5mM EDTA (Biochrom A, in PBS) lösen
- $2,5 \cdot 10^5$ Zellen mit met-RANTES-GPI (0 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml) 60 Min bei 33°C inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Primären Antikörper hinzufügen (IgG_{2κ} anti-RANTES-Antikörper (VL-3, 5µg/ml), oder IgG_{2κ}-Isotyp-Antikörper (Sigma-Aldrich, 5µg/ml))
- 60 Minuten auf Eis inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Sekundären Antikörper hinzufügen (FITC-konjugierter Esel-Anti-Maus IgG-Antikörper (DAKO A/S, Dänemark))
- 30-45 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Im Fluss-Zytometer (FACS Calibur) zählen und mit Hilfe der CellQuest Analyse-Software analysieren

Reinkorporation in HuMVEC-Zellen

Nach ähnlichem Muster wurde die Reinkorporation in adulte humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HuMVECs) getestet. Es wurden HuMVEC-Zellen (jeweils $5-10 \cdot 10^6$ Zellen) mit ansteigenden Konzentrationen met-RANTES-GPI 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach ausführlichem Waschen wird erneut ein primärer anti-CCL5-Antikörper (VL-3) (von Luettichau, Nelson et al. 1996) und ein Fluoreszenz-Markierter sekundärer Antikörper hinzugefügt. In dem Fluss-Zytometer kann die Reintegration der GPI-verankerten Proteine in die Oberflächenmembran HuMVEC-Zellen analysiert und mit einer Kontrollgruppe verglichen werden.

Protokoll:

- $5-10 \cdot 10^6$ Zellen mit met-RANTES-GPI (150, 300, 450 und 700 ng/ml) 60 Min bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Primären Antikörper hinzufügen (IgG_{2κ} anti-RANTES-Antikörper (VL-3, 5µg/ml), oder IgG_{2κ}-Isotyp-Antikörper (Sigma-Aldrich, 5µg/ml))
- 60 Minuten auf Eis inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Sekundären Antikörper hinzufügen (FITC-konjugierter Esel-Anti-Maus IgG-Antikörper (DAKO A/S, Dänemark))
- 30-45 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubieren
- Mehrfach mit PBS waschen, zentrifugieren und Überstand dekantieren
- Im Fluss-Zytometer (FACS Calibur) zählen und mit Hilfe der CellQuest Analyse-Software analysieren

GPI-Anker Abspaltung durch Phospholipase C

Nach Reinkorporation von metRANTES-GPI in adulte humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HuMVECs) wurden die Zellen zur Abspaltung des Chemokinrezeptor-Antagonisten mit Phospholipase C inkubiert. Dabei wurde sie in einem Serum-freien Medium 60 Minuten lang bei 37°C und 5 % CO₂ mit 60ng/ml einer phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PLC) (SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, Germany No. 661-9) behandelt.

Sonstige Materialien

Geräte

	<u>Bezeichnung:</u>	<u>Hersteller:</u>	
Zentrifugen:	Biofuge 15	Heraeus Instruments,	Hanau
	Minifuge T	Heraeus Instruments,	Hanau
	Centrifuge5417 R	Eppendorff,	Hamburg

	Sorvall	RC-5B	mit	den
	Rotoren		GS-3,	GSA,
	HB-6 u. SS34		DuPont Instruments	
	Ultrazentrifuge		Beckman	L70
	mit		den	Rotoren
	Vti65 und Ti45		Beckman Instruments	
	Ultra-Minizentrifuge			
	Optima			TL
	mit Rotor TLV-100		Beckman Instruments	
Elutriator:	J6M		Beckman	Instruments
Mixer:	Vortex Genie 2		Bender&Hobein,	Zürich
sterile Werkbänke:	Werkbank 1		BioFlow,	Meckenheim
	sterilGard Hood		Baker, Sanford	Maine
Mikroskop:	Leitz, Diavert		Leica,	Ismaning
Luminometer:	Lumat, LB 9501		Berthold, Bad	Wildbad
	Lumat, LB 9507		Berthold, Bad	Wildbad
Netzgeräte:	PowerPac 300		Bio Rad,	München
	PowerPac 3000		Bio Rad,	München
ELISA-Reader:	BioMek 1000		Beckman	Instruments
Wasserbad:	DC-1		Haake,	München
Spektralphotometer:	Du 62		Beckman	Instruments
UV-Ofen:	GS GeneLinker		Bio Rad,	München
Hybridisierungsöfen:			Bachofer	
Geltrockner:	Gel dryer 583		Bio Rad,	München
Transformationsgerät:	E. coli Pulser		Bio Rad,	München
Brutschrank:	BB 6220 CU		Heraeus Instruments, Hanau	
Sterilfiltration:	Centricon concentrator		Millipore, Eschborn	
	Amicon Ultra 10,000 MWCO			
Äkta - Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) Gerät der Firma Amersham				
Flusszytometer:	FACS Calibur		Becton,Dickinson&Co, USA	

V ERGEBNISSE:

Die Hypothese, dass nicht-spezifische Aspekte entzündlicher Prozesse wie z.B. der akuten Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantationen durch eine selektive Inhibition von Chemokinrezeptoren moduliert werden kann, konnten Gröne et al. in *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen bestätigen. Durch Met-RANTES, einem CCL5-Derivat, das als potenter CCR1- und CCR5-Rezeptor-Antagonist fungiert, kann eine Abstoßungsreaktion effektiv reduziert und in Kombination mit anderen Substanzen fast völlig unterdrückt werden. Met-RANTES konnte die Adhäsion von Monozyten an aktivierte Endothelien verhindern und so die Einwanderung von Monozyten ins Gewebe unterbinden (Grone, Weber et al. 1999).

Das „protein engineering“ genannte Verbinden eines Proteins mit einem GPI-Anker bietet die Möglichkeit, durch Reintegration in die Oberflächenmembranen unterschiedlicher Gewebe, Proteine an definierte Lokalisationen zu bringen. Dort können sie, dank der Fähigkeit, sich in die Membranen anderer Zellen zu reintegrieren und die ursprüngliche Funktion wieder anzunehmen (Premkumar, Fukuoka et al. 2001; Djafarzadeh, Noessner et al. 2006), längere Zeit verbleiben.

Ziel dieser Arbeit war es, Chemokinrezeptor-Antagonisten zu generieren, die selektiv die Einwanderung von aktivierten T-Zellen und Monzyten in transplantierte Organe für den Zeitraum direkt nach Transplantation blockieren um somit eine akute Entzündungsreaktion zu verhindern. Die Antagonisierung der beteiligten CCR1- und CCR5-Rezeptoren wird durch Hinzufügen eines Methionin am N-Terminus des CCL5/RANTES Proteins erreicht. Dazu wurde eine Methionin-kodierende Sequenz zwischen die Signalsequenz und das CCL5-Gen mittels Mutagenese-Kit eingefügt. Das CCL5-Protein hat eine starke Tendenz zur Multimerisierung, die durch GPI-Verankerung in der Einheitsmembran verstärkt werden kann. Dies kann aber eine Abschwächung der Antagonisierung zur Folge haben. Eine Verhinderung dieser Aggregation ist durch Austausch des Glutamats an Position 26 oder Position 66 mit einem Alanin möglich. Durch diese Mutationen entstehen eine tetramerisierende, respektive dimerisierende Form des Chemokinrezeptorantagonisten. Das native CCL5 Protein wird von Thrombozyten freigesetzt und bindet über elektrostatische Wechselwirkungen an den Glukosaminoglykanen (GAGs) die an der Endotheloberfläche exprimiert werden. Durch Mutation dreier Aminosäuren kann diese Bindungsaffinität verhindert werden. Die Bindung an die Endotheloberfläche ist daraufhin ausschliesslich von

der Lipidverankerung abhängig. Als Lipidanker wurde der in allen eukarionten Zellen vorkommende GPI-Anker ausgewählt. Die Signalsequenz zur Verankerung an den Anker wurde dem LFA3-Protein entnommen. Um sicher zu sein, dass diese C-terminale Verankerung nicht eine Konformationsänderung verursacht und somit eventuell die Funktion des Chemokins beeinträchtigt, wurde eine flexible Struktur mit sechs kleinen Aminosäuren (Prolin, Glycin, Alanin) zwischen Anker und Chemokinrezeptor-Antagonist eingefügt. Die entstandenen Konstrukte konnten nun in einen Expressionsvektor subkloniert und mittels Transformation in Chinese Hamster Ovarial-Zellen (CHO-Zellen) exprimiert werden. Diese Membran-Verankerten Proteine wurden aus der Einheitsmembran extrahiert und in einem weiteren Schritt durch verschiedene Chromatographieverfahren isoliert. In ersten in-vitro Experimenten wurde die Reintegration in die Oberflächenmembranen von CHO-Zellen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen getestet. Nachdem die Reinkorporation in fremde Zelloberflächen so gesichert wurde, können die GPI-gekoppelten Proteine für immunmodulatorische Studien zur Verfügung stehen, in der Annahme, dass sie einen verlängerten Effekt an den Endothelien ausüben.

In einem letzten Schritt wurde eine neue Generation der GPI-verankerten Immunmodulatoren entwickelt. Sie basiert auf der viralen Chemokinbiologie und mildert die zytotoxische Entzündungsreaktion ab, indem sie die Th2-Zellen Immunantwort und somit eine humorale Antwort fördert.

Konstruktion der Chemokin-basierten Antagonisten

Humanes RANTES/CCL5 wurde mittels CCL5-spezifischer primer und PCR (siehe Material und Methoden) von einer cDNA kloniert (Schall, Bacon et al. 1990). Das RANTES/CCL5 Stoppkodon wurde mutiert, damit eine C-terminal fusionierte Sequenz auch exprimiert würde. Weiterhin wurde die GPI-Signalsequenz aus der LFA-3 cDNA (Kirby, Hill et al. 1995) kloniert und an den C-Terminus des CCL5-Moleküls geknüpft.

In einem nächsten Schritt konnte CCL5-GPI nun mit dem Quick-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene; siehe Material und Methoden) zum methionierten met-RANTES-GPI mutiert werden. In diesen GPI-verbundenen CCL5-Antagonisten konnten nun nach Protokoll drei unterschiedliche Mutationen eingeführt werden. Zuerst wurde die dimerisierende Form E66A mutiert. Dabei wird an der Position 66 das Glutamat mit einem Alanin ausgetauscht. Bei der tetramerisierenden Mutation

hMetRANTES-GPI

- *sense*-Primer 5'-CCTGCATCTGCCATGTCCCCATATTCCTCG-3'
- *antisense*-Primer 5'-GGACGTAGACGGTACAGGGGTATAAGGAGC-3'

hRANTES E26A-GPI

- *sense*-Primer 5'-CGTGCCCACATCAAGGCGTATTTCTACACCAG-3'
- *antisense*-Primer 5'-CTGGTGTAGAAATACGCCTTGATGTGGGCACG-3'

hRANTES E66A-GPI

- *sense*-Primer 5'-TACATCAACTCTTTGGCGATGAGCTCTAGAACAACC-3'
- *antisense*-Primer 5'-GTTGTTCTAGAGCTCATCGCCAAAGAGTTGATGTAC-3'

hRANTES 44AANA47-GPI

- *sense*-Primer
5'-GTCGTCTTTGTCACCGCAGCGAACGCCCAAGTGTGTGCCAACCC-3'
- *antisense*-Primer
5'-GGGTGGGCACACACTTGGGCGTTCGCTGCGGTGACAAAGACGAC-3'

vMIP-II - GPI

- *sense*-Primer 5'-CGGCGGGCGGAATTCGGACACACGAG-3'
- *antisense*-Primer 5'-CGCGGCGCCTCTAGA-GCGAGCAGTACTG-3'

Abbildung 13: Sequenzen der Mutageneseprimer, mit denen erfolgreich die GPI-verbundenen Chemokin-Analoga (metRANTES-GPI, hRANTES E26A-GPI, hRANTES E66A-GPI, hRANTES 44AANA47-GPI, vMIP-II – GPI) hergestellt wurden

E26A wird das Glutamat der Position 26 ausgewechselt (Appay, Brown et al. 1999). Zuletzt wurde auch noch die GAG-bindende Domäne durch Austausch von drei basischen mit drei ungeladenen Aminosäuren auf Position 44-47 (von CCL5-⁴⁴RKNR⁴⁷ zu CCL5-⁴⁴AANA⁴⁷) verändert und in das methionierte CCL5-GPI Konstrukt eingeführt (Proudfoot, Fritchley et al. 2001).

Die Sequenzen der Mutageneseprimer, mit denen erfolgreich die GPI-verbundenen Chemokin-Analoga hergestellt wurden, sind in Abb. 13 zusammengestellt.

Somit standen mit metRANTES-GPI, metRANTES(E66A)-GPI, metRANTES(E26A)-GPI, metRANTES(⁴⁴AANA⁴⁷)-GPI und vMIP-II-GPI fünf, an einen Lipidanker gekoppelte, Chemokin-Rezeptorantagonisten zur Verfügung.

Analyse der CHO-Zellen Oberflächenexpression

Nachdem die GPI-gebundenen Chemokinrezeptor-Antagonisten durch Mutation hergestellt worden waren, wurden sie, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, durch diagnostischen Verdau und Sequenzierung auf korrekte DNA-Sequenz kontrolliert. Durch Ligation wurden sie mit dem Transfektionsvektor pEF zusammengeführt und mittels Verdau linearisiert.

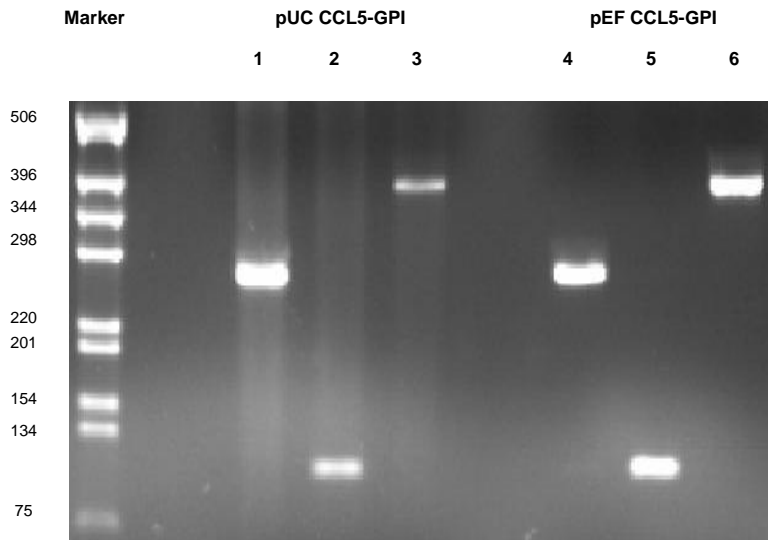


Abbildung 14: Diagnostischer Verdau des CCL5-GPI Konstruktes im pUC-Vektor und nach Ligation mit dem pEF-Vektor. Verdau mit *EcoRI* / *Xba* I (Spalten 1 + 4) ergibt das 284 bp grosse CCL5, Verdau mit *Xba* I / *Sal* I (Spalten 2 + 5) das GPI-Molekül (120 bp) und Verdau mit *EcoRI* / *Sal* I (Spalten 3 + 6) das 404 bp grosse metRANTES-GPI.

Der Vektor konnte nun mit der Elektroporationsmethode in DHFR-defiziente, sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche, Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO/dhfr⁻) stabil transfiziert werden.

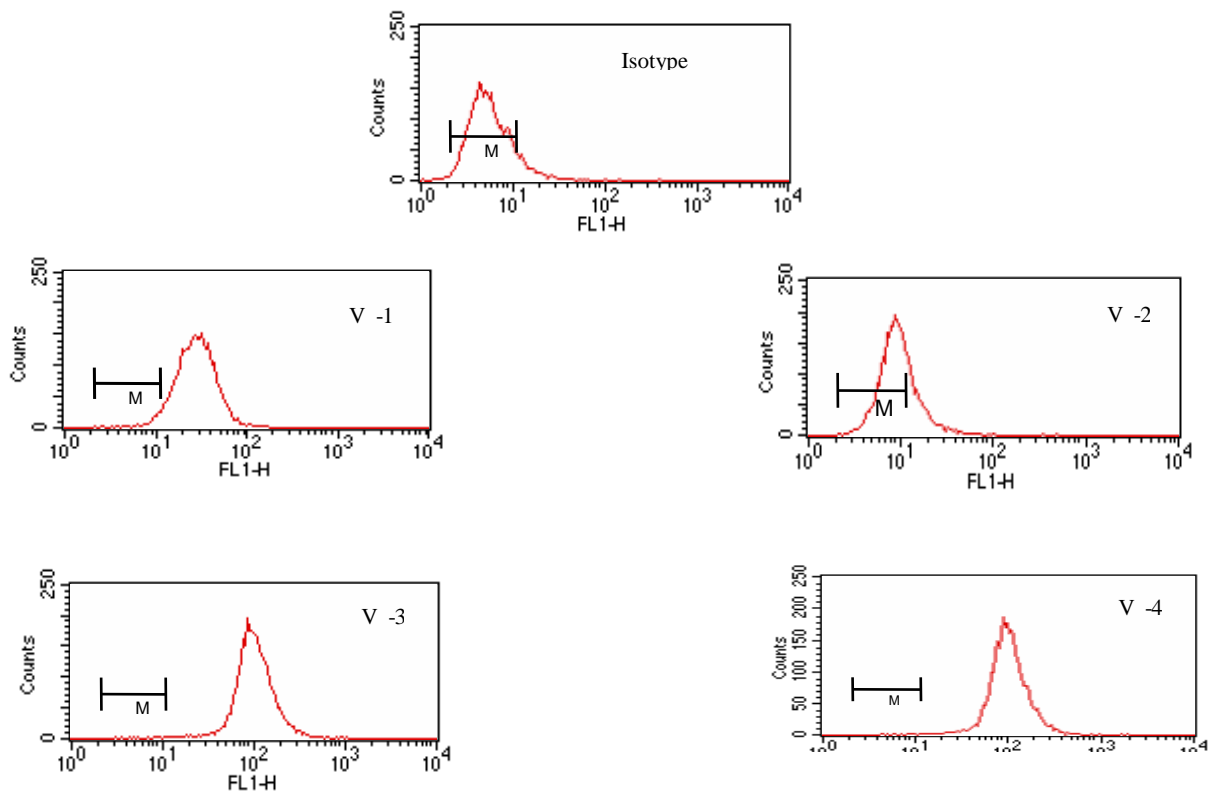


Abbildung 15: FACS-Analyse der Oberflächenexpression von RANTES-GPI auf CHO-Zellen mit vier unterschiedlichen Anti-RANTES-Antikörpern (VL-1 bis -4).

Durch Kultur in Selektionsmedium wurden die Zellen, welche keinen met-RANTES-GPI-Vektor aufgenommen hatten, ausselektiert. Nach mehrmaligem Teilen („splitting“) und Umsetzen der transfizierten CHO-Zellen, wurde die Oberflächenexpression der CCL5-GPI-Konstrukte durch „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS-) Analyse kontrolliert. Die transfizierten Zellen wurden mit den anti-RANTES Antikörpern (von Luettichau, Nelson et al. 1996) oder einem Isotyp-Kontrollantikörper (IgG_{2κ}) inkubiert und mittels FACS-Analyse gezählt. Eine im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle bestehende Rechtsverschiebung gibt ein verstärktes Fluoreszenz-Signal an, bzw. eine größere Anzahl Zellen an deren Oberfläche ein Primäantikörper gebunden ist. Dank der vier zur Verfügung stehenden anti-RANTES Antikörper (VL1-4, alle vom Typ IgG_{2κ}) konnten zwei unterschiedliche Ziele erreicht werden. Zum einen konnte die Oberflächenexpression der Konstrukte und somit die korrekte Transfektion der pEF-Vektoren nachgewiesen werden. Auch zeigte ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals, dass die Chemokinaloga dank des GPI-Ankers in der Einheitsmembran der CHO-Zellen integriert sind. Ein fälschlicherweise nicht an den GPI-Anker gebundenes Konstrukt oder aber das ursprüngliche CCL5 wird als solubles Protein durch die ausführlichen Waschschrte entfernt. Somit ist im Sinne eines „proof of principle“ die Verankerung an das Glukoinositolphosphat und die Transfektion und Produktion in den Chinese-Hamster-Ovary Zellen gezeigt.

	VL-1	VL-2	VL-3	VL-4
RANTES-GPI	+++	+	++++	++++
Met-RANTES-GPI	+	-	+	+
Met-RANTES-E66S-GPI	+	-	++	++
Met-RANTES-E26A-GPI	++	+	++++	++++
Met-RANTES-⁴⁴AANA⁴⁷-GPI	+	+	-	-

Tabelle 1: FACS-Analyse. Bindungsaffinität der anti-RANTES Antikörper an die Oberflächenexprimierten RANTES-Konstrukte.

Zum Anderen ermöglichte die FACS-Analyse aber auch, die Bindungsaktivitäten der einzelnen anti-RANTES Antikörper zu den GPI-gebundenen Chemokinanaloga zu analysieren und zu vergleichen. Durch die Verankerung an ein GPI-Molekül konnte es zu einer Modulation oder einen Verlust der Antikörper bindenden Domäne kommen. Ziel war es somit, einen funktionstüchtigen Antikörper als Primärantikörper für nachfolgende Western-Blot Analysen, sowie den Antikörper zur Herstellung der CNBr-aktivierten Immunoaffinitäts-Sepharose auszuwählen.

Nach Auswertung der FACS-Analysen der unterschiedlichen Chemokinrezeptorantagonisten wurde für weitere Western-Blot Analysen der Antikörper VL-1 ausgewählt. Des Weiteren wurde der VL-3 Antikörper als passend für die Immunoaffinitäts-chromatographie identifiziert.

Protein-Extraktion

Um die GPI-verankerten CCL5-Konstrukte aufzureinigen, mussten sie zuerst aus den Membranen der CHO-Zellen extrahiert werden. Wie schon detailliert beschrieben, wurden dazu zuerst die CHO-Zellen lysiert und die Membranen abzentrifugiert. Nun sollten in einem nächsten Schritt die besten Bedingungen für die Proteinextraktion herausgestellt werden. Als Detergens wurde, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, hochdosiert (1%ig) Triton X-100 benutzt (Medof, Nagarajan et al. 1996).

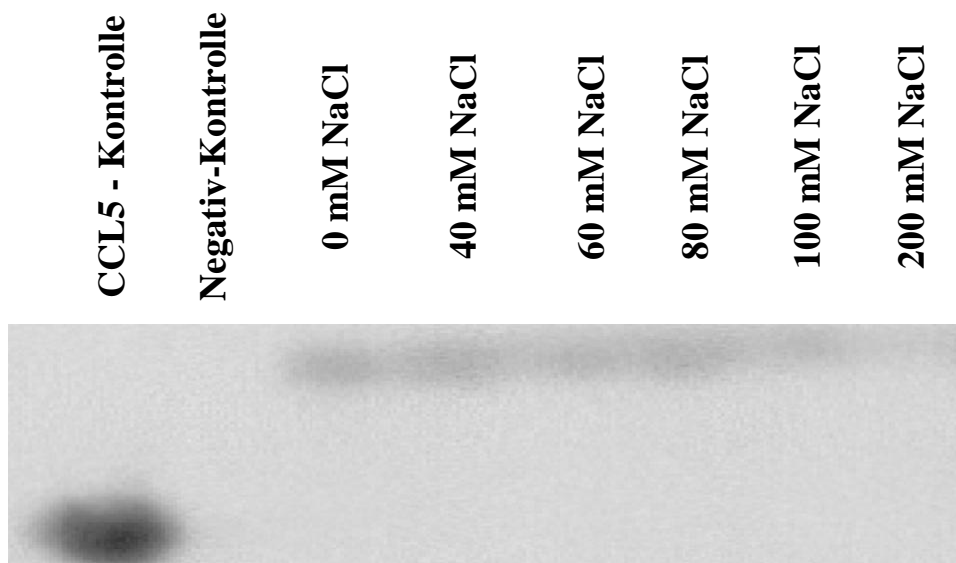


Abbildung 16: Extraktionen von metRANTES-GPI mit 1% Triton X-100 und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Leichte Signalvermehrung bei 40 mM NaCl.

Da unterschiedliche Salzkonzentrationen im Extraktionspuffer zu verschiedenen Mengen extrahierten Proteins führen können, wurden in einem Versuch Extraktionsbedingungen mit 0 bis 200 mM NaCl getestet. Die verschiedenen extrahierten Proteine wurden mittels Protein-Quantifizierung nach Bradford gemessen und auf gleiche Konzentrationen gebracht. Nun wurden sie mit Western-Blot Analyse verglichen. Abbildung 16 zeigt, dass bei 40 mM NaCl eine leichte Signalvermehrung zu vermerken ist. Es wurde somit fortan der Extraktionspuffer mit 1% Triton X-100 und 40 mM NaCl, sowie den üblichen Proteinase-Inhibitoren verwendet.

CCL5-Konstrukte

Im nächsten Schritt, sollten die extrahierten Proteine der einzelnen CCL5-GPI Mutationen auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot mittels IgG_{2κ}-Antikörper analysiert werden. Nachdem die Konstrukte auf die korrekte Mutation hin mittels Sequenzierung kontrolliert wurden und die Oberflächenexpression durch „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS-) Analyse nachgewiesen wurde, war es nun von Bedeutung die erfolgreiche Extraktion jedes einzelnen Proteins aus der Doppelmembran der CHO-Zellen zu kontrollieren. Dazu wurden nach oben beschriebenem Protokoll die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen CHO-Zellen lysiert und die membrangebundenen Proteine extrahiert.

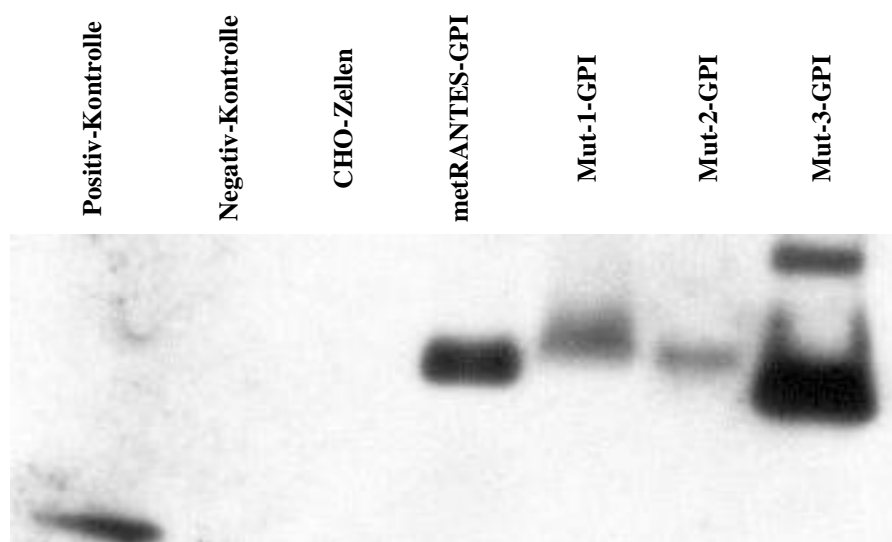


Abbildung 17: Western-Blot der extrahierten metRANTES-Konstrukte

Das Western Blot ergab ein positives Signal für alle unterschiedlichen Konstrukte. Es fanden sich Banden auf der Höhe eines Dimers, sowie für die dritte Mutation (hRANTES

44AANA47-GPI) eine weitere Bande auf der Höhe eines Tetramers. Das Wissen um die Di- und Tetramerisierung ist unter Anderem von Bedeutung, da natives RANTES *in-vitro* und *in-vivo* zu starker Multimerisierung tendiert.

Protein-Isolierung

Immunoaffinitäts-Chromatographie

Der in Rollerflaschen aus Hybridom-Zellen produzierte VL-3 anti-RANTES Antikörper wurde auf eine Protein G Chromatographiesäule gebunden und bei einem pH von 2,5 eluiert. Der aufgereinigte Antikörper wurde auf ein SDS-Gel geladen. Um eine ausreichende Reduzierung der Disulfidbrücken zu gewährleisten wurden zum DTT-haltigen Ladepuffer noch 1:20 Mercaptoethanol hinzugegeben und die Fraktionen zuerst 30 Minuten bei 45°C inkubiert. Nach einem 30 minütigen Färbeschritt wurde über Nacht entfärbt. Diese Kontrolle zeigte eine ausreichende Aufreinigung der Antikörper. Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford ergab eine Gesamtmenge von 7,6 mg VL-3 Antikörpers. Diese wurde nun nach Protokoll mit 3ml CnBr-aktivierter Sepharose kovalent verbunden. Die erreichte Konzentration von 2,53 mg Antikörper pro ml Sepharose liegt im idealen Bindungsbereich für die Immunoaffinitäts-Chromatographie (zwischen 2 und 3 mg/ml; mdl. Mitteilung E. Kopp, Institut für Immunologie, München). Die Kontrollsepharose mit einem Maus-Isotyp-IgG2b Antikörper wurde ebenfalls in einer Konzentration von 3 mg/ml hergestellt.

Das extrahierte met-RANTES-GPI wurde nun nach dem sehr komplexen, oben beschriebenen Protokoll auf die Immunoaffinitäts-Säulen, der die Isotyp-Kontrollsäule vorangeschaltet war, aufgetragen. In mehreren Waschschritten wurde nun der pH von 8,0 im Äquilibriumspuffer auf bis zu 11,5 angehoben. Weiterhin besitzen die zwei intermediären Waschpuffer einen NaCl-Gehalt von 0,5 M, um weitere unspezifische Bindungen zu kappen. In der Abbildung 18 zeigt die braune Kurve die gemessene Leitfähigkeit der Puffer, die dem Salzgehalt entspricht. Die Lichtabsorption von Proteinen die eluiert werden, wird beim Äkta - Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) Gerät mit Hilfe eine UV-Lampe gemessen. Die UV-Messkurve ist hier blau dargestellt. Das programmierte Wasch- und Elutionsprogramm ist in grüner Farbe dargestellt.

Bevor das zu reinigende Protein aufgetragen wird, wird diese Kurve auf null geeicht. In der hiesigen Kurve sind jedoch die ersten 30 ml des Durchlaufs auf einem erhöhtem Niveau von rund 1000 mAU. Dies hängt mit den unterschiedlichen Triton X-100 Gehalten der Wasch-

und Elutionspuffer zusammen, da das Detergens selbst auch UV-Licht absorbiert. Der Äquilibriumspuffer enthält 1%iges Triton, während die weiteren Puffer nur 0,1% Detergens besitzen und die 10fache Konzentration an Detergens führt zu einer stark erhöhten UV-Absorption.

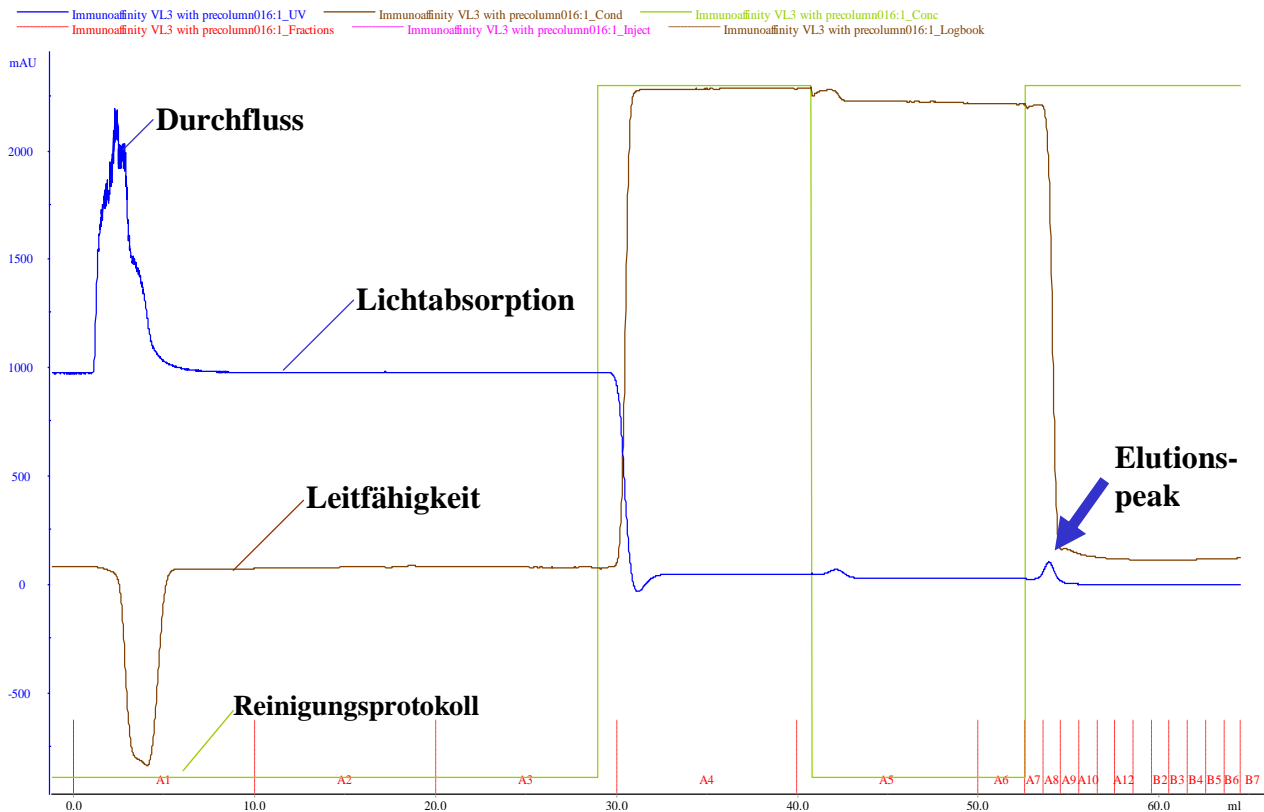


Abbildung 18: Immunoaffinitätssäule mit Anti-RANTES VL-3-Antikörper. Nach dem Durchfluss (A1) finden zwei ausführliche Waschschrte statt. Bei einführen des Elutionspuffers wird mRANTES-GPI eluiert (blauer Pfeil, A8-9).

Direkt nach dem Auftragen des extrahierten met-RANTES-GPI, kommt es zu einer grossen, gipfelartigen UV-Signalvermehrung um über 1000 mAU. Dies deutet den Durchfluss der nicht gebundenen Proteine an. Nach den weiteren Waschschrten und bei Einsetzen des Elutionspuffers, kommt es in den Fraktionen A8-A9 zu einem sehr kleinen Elutions-peak (blauer Pfeil). Die von Amersham mitgelieferte Software Unicorn 4.0 erlaubt es, als erste und grobe Einschätzung, bei der Auswertung eine Integralberechnung der Fläche unter der Kurve („area under the curve“) durchzuführen. Für den kleinen Elutionspeak wurde 590.876 mAU*ml gemessen, welches nur 2,79 Prozent der Fläche des Durchfluss-Gipfels darstellt (21.196.463 mAU*ml).

Die Western Blot Analyse der Immunoaffinitäts-Chromatographie zeigt ein ähnliches Ergebnis. In der Durchflussfraktion A1 geht sehr viel met-RANTES-GPI verloren, welches

sich im Blot in unterschiedlicher Oligo- und Multimerisierung darstellt. Auf der anderen Seite findet sich in der Elutionsfraktion A9 nur sehr wenig nachweisbares metRANTES. Die sehr dünnen Banden stellen sich auf einer Höhe von ungefähr 36, 64 und 120 kDa dar, welches einer Tetra-, Octa- und 16-fach Multimerisierung entspricht.

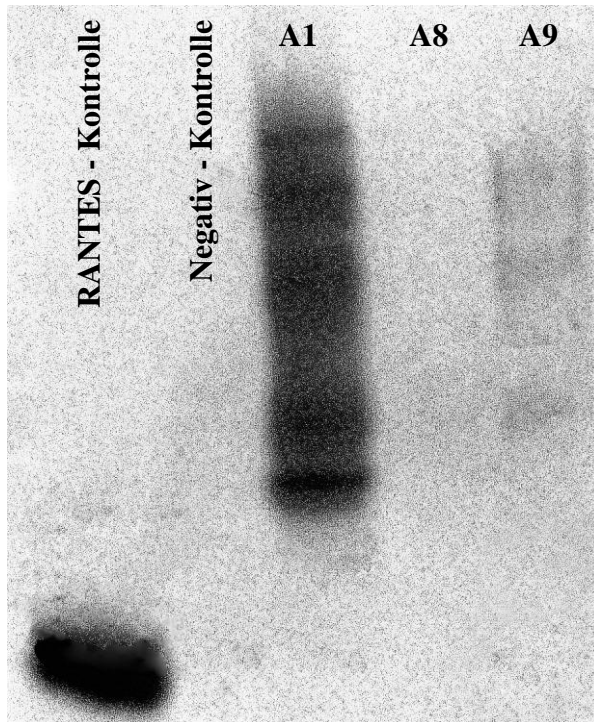


Abbildung 19: Western Blot Analyse der Elutionsfraktionen A1, A8 und A9. Während im Durchfluss A1 sehr viel Material des metRANTES-Konstrukts verschiedener Grösse verloren gehen, finden sich in der Elutionsfraktion A9 nur drei sehr dünne Banden, die auf Höhe von ~36, 64 und 120 kDa einem Tetra-, Octa- und 16-fach Multimer entsprechen.

Sowohl das UV-Profil der Reinigung, als auch die nachfolgende Western Blot Analyse der Fraktionen zeigen ein recht enttäuschendes Ergebnis. Zwar werden RANTES-Konstrukte von anderen Proteinen sehr spezifisch getrennt und es finden sich viele membrangebundene Proteine in der Durchfluss-Fraktion. Aber die Immunoaffinitäts-Säule bindet zu geringe Mengen des met-RANTES-GPI und somit verlieren sich große Mengen dieses Proteins im allgemeinen Durchfluss. Das gewonnene Chemokin-Analogon findet sich in so geringer Quantität, dass es an der Grenze des Detektierbaren im sehr sensitiven Western-Immunoblot ist. Somit ist die Immunoaffinitäts-Säule als funktionstüchtig anzusehen, da jedoch die Ausbeute an aufgereinigtem Protein nicht zufriedenstellend ist, wurden andere Chromatographie-Schritte getestet.

Kationen-Austauscher

Ein Ionen-Austauscher besteht aus einer nicht löslichen Matrix, an der geladene Gruppen kovalent verbunden wurden. Die Art der gebundenen Gruppe bestimmt die Art und Stärke des

Ionenaustauschers. Die geladenen Gruppen sind mit mobilen Gegen-Ionen assoziiert. Diese Gegen-Ionen können reversibel mit anderen Ionen derselben Ladung ausgetauscht werden, ohne die Matrix zu verändern. Somit können geladene Moleküle gebunden werden und im Elutionsschritt durch Anheben der Salzkonzentration des Puffers die Bindungsaffinitäten aufgefächert und das Molekül von schwächer oder stärker geladenen Stoffen getrennt werden.

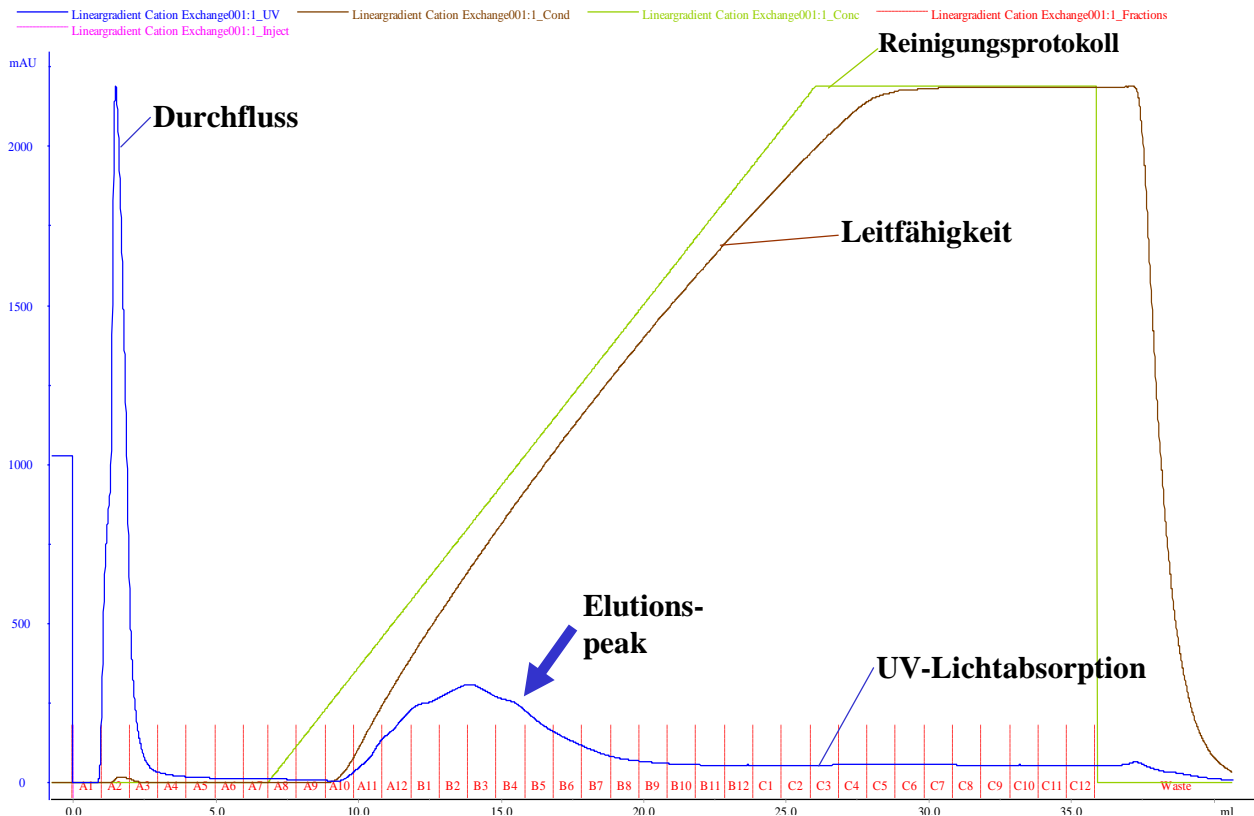


Abbildung 20: Kationen-Austauscher Elution mit linearem Gradienten. Es findet sich ein Peak (Fraktion B2-3) mit vorderer (A12-B1) und hinterer Schulter (B4).

In unserem Fall sind die aufzureinigenden Proteine RANTES-Derivate. Da RANTES als stark basisches Chemokine, positiv geladen ist, wurde in dieser Versuchsreihe ein Kationenaustauscher ausgewählt. Dieser besitzt als funktionelle Gruppe einen Sulphopropyl- (SP-) Rest ($-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$), welcher in einem breiten pH-Spektrum negativ geladen ist und somit einen starken Kationenaustauscher bildet.

Nach dem Auftragen des Proteins wurde zur Elution des gebundenen Proteins ein linearer Gradient ansteigender NaCl-Konzentrationen (grüner Graph) eingesetzt, der bis auf eine maximale Konzentration von 2000 mM reichte. Wiederum zeigt in Abbildung 20 die braun gefärbte Kurve die von der Salzkonzentration abhängige Leitfähigkeit an. Die blaue Kurve für die UV-Absorption zeigt direkt nach dem Proteinauftrag einen sehr spitzen, um die 2000 mAU hohen Gipfel (Fraktionen A2 und A3). Wie schon bei der Immunoaffinitäts-

Chromatographie zeigt er den Durchfluss nicht gebundener Proteine an. Des Weiteren findet sich ein Peak in den Fraktionen B2-3, der eine vordere (A12-B1) sowie eine hintere Schulter (B4-7) besitzt.

Zur Kontrolle, in welcher der Fraktionen, sich das GPI-gebundene RANTES-Analogon befindet, wurde wieder ein Western-Blot mit VL-1 anti-RANTES-Antikörper erstellt. Dieses zeigt, wie in Abbildung 21 zu sehen ist, dass neben der Durchfluss-Fraktion A2 nur die Fraktionen B4-7 das gesuchte Konstrukt beinhalten und dass sich im eigentlichen Gipfel (B2-3) und seiner vorderen Schulter (A12-B1) ein anderes, durch diesen Chromatographie-Schritt getrenntes Protein befindet. Die hintere Schulter (siehe Abb. 20: blauer Pfeil) ist somit der gewünschte Punkt, an dem der Kationen-Austauscher seine Bindung zum met-RANTES-GPI löst.

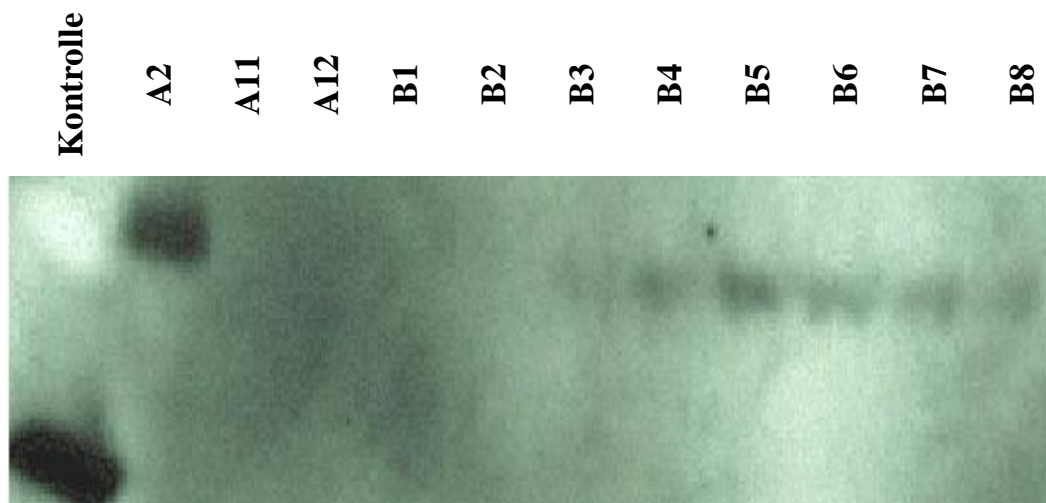


Abbildung 21: Western Blot der Elutionsfraktionen nach Kationen-Chromatographie. MetRANTES-GPI wird in den Elutionsfraktionen B4-B7, sowie in der Durchfluss-Fraktion A2 nachgewiesen.

Mit Hilfe des gemessenen Elutionsprofils, kann die Salzkonzentration, bei der die Elution stattfindet errechnet werden. Die hintere Peakschulter beginnt bei einer gemessenen Leitfähigkeit von 53,5 mS (milli-Siemens) und endet bei 83,7 mS. Dies entspricht in dem Elutionsprotokoll mit linearem Gradienten (0mM → 2000mM NaCl) einer Spanne von 780mM bis 1220 mM NaCl. Mit diesem Wissen kann nun ein verfeinertes Protokoll mit Stufengradienten erstellt werden.

Um die Reinheit der eluierten Fraktion zu verifizieren, wurden Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mittels Silbernitratlösung wurden, wie oben beschrieben, unspezifisch Proteine angefärbt. Diese zeigte neben der Anwesenheit des dimerisierten RANTES-Analogons, noch zwei weitere, schwache Banden eines Proteins, welches im Western-Blot nicht auftaucht und somit als fremd zu identifizieren ist (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass nach der Kationen-Chromatographie ein weiterer Schritt für die Aufreinigung der Chemokin-Präparate notwendig ist.

Als grobe Einschätzung der Reinigungseffizienz wurde erneut die „area under the curve“ der einzelnen Proteingipfel berechnet. Die met-RANTES-haltige hintere Schulter des Elutionsprofils beträgt 6.367.270 mAU*ml, was 44,50 % der Fläche der Durchflussfraktion (14.309.374 mAU*ml) ausmacht.

Zwar zeigen diese Berechnungen, sowie der Western-Immunoblot, dass ein Teil der aus den CHO-Zellen extrahierten Proteine nicht an die Kationen-Matrix bindet und sich sofort in der Durchfluss-Fraktion wieder findet. Dennoch ist die Ausbeute des aufgereinigten met-RANTES-GPI im Vergleich zum Immunoaffinitäts-Verfahren deutlich erhöht. Die Kationenaustauscher-Chromatographie stellt somit eine effektive Methode dar, die GPI-gebundenen RANTES-Konstrukte aufzureinigen. Er bedarf jedoch eines weiteren Schrittes, um eine ausreichende Reinheit für *in-vitro* und *in-vivo* Versuche zu erreichen.

Heparin Chromatographie

Heparin gehört zu der Gruppe der Glukosaminoglykane und besteht aus der Aneinanderkettung von Zuckermolekülen. Glukosaminoglykane besitzen starke elektrostatische Wechselwirkungen mit einer Reihe Proteinen. So besitzen viele Chemokine eine GAG-bindende Domäne, die ihnen die elektrostatische Bindung an die Zelloberfläche (z.B. von Endothelialzellen) erlaubt.

Diese Eigenschaften des Heparins macht man sich in einem eigenen Chromatographieschritt zu Nutze. Analog zur Ionenaffinitäts-Sepharose, besteht die Heparinaffinitäts-Sepharose aus einer nicht löslichen Matrix und einer funktionellen Gruppe (dem namensgebenden Heparin). Wie schon bei der Ionenaustauscher-Chromatographie werden bei Heparinsäulen die Affinitätsbindungen zu den Proteinen mit steigenden Salzkonzentrationen - je nach Bindungsstärke - gelöst.

Vergleichbar mit den anderen Chromatographieverfahren, wird die Säule mit einem salzarmen Puffer äquilibriert und das extrahierte, GPI-gebundene Protein aufgetragen. Ein linear ansteigender Gradient eines NaCl-reichen Puffers – sichtbar in der grün gefärbten

Kurve - führt zu Konzentrationen bis 3000 mM. Die braune Kurve gibt erneut die gemessene Salzkonzentration und die blaue Kurve die UV-Absorption an.

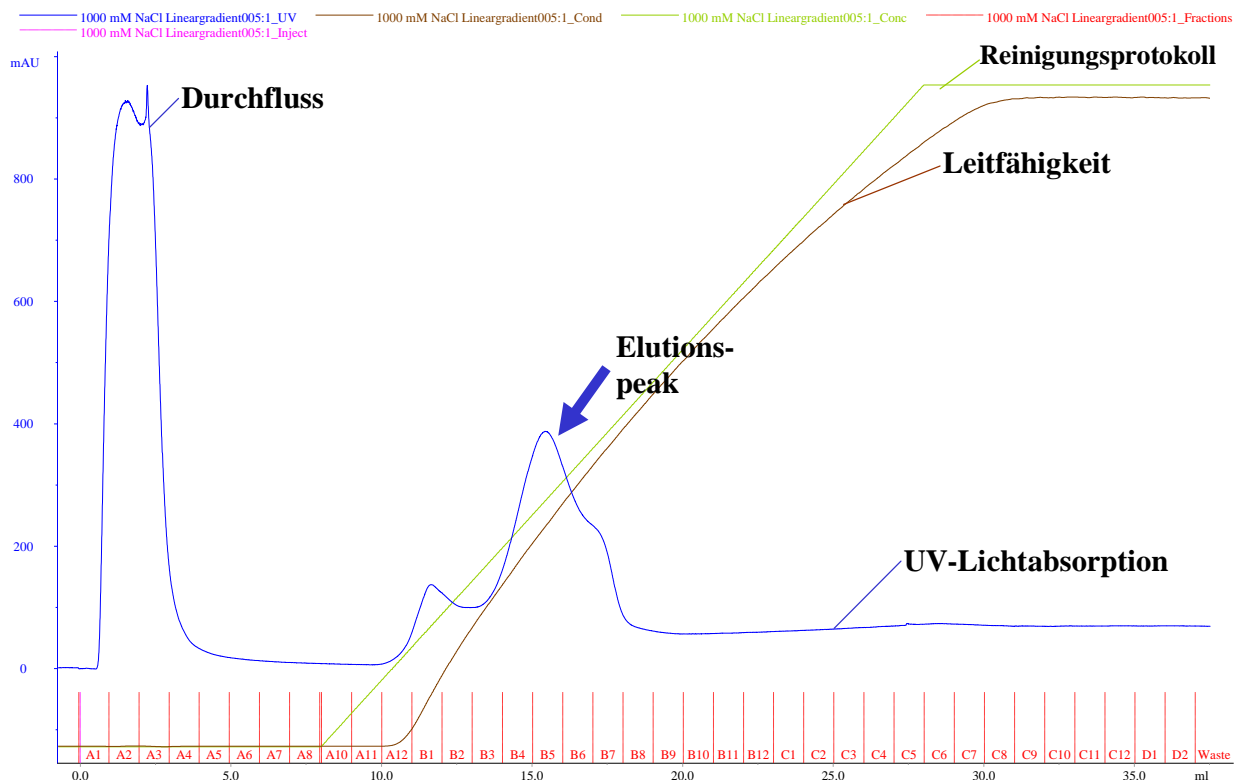


Abbildung 22: Heparin Elutionen. Die UV-Kurve zeigt die Elution von Proteinen an. Neben dem Durchfluss (Fraktionen A2-4) zeigen sich eine Spitze in Fraktion B1 und ein zweiter Peak mit Schulter zwischen B4 und B7.

Kurz auf den Auftrag des Proteins folgend, zeigt sich ein etwa 2,5 ml breiter, 900 mAU hoher Durchfluss von nicht an der Heparin-matrix bindenden Proteinen (Fraktionen A1-A3). Im Weiteren Verlauf des Elutionsverfahrens finden sich zwei weitere Gipfel: ein erster zwischen Fraktionen A12 und B1-B2, mit einer Spitze um 140 mAU, und ein zweiter in den Fraktionen B2 bis B7 mit dem höchsten Punkt um 390 mAU. Letzterer besitzt eine hintere Schulter in den Fraktionen B6-B7 mit Hochpunkt bei 220 mAU.

Der erste Peak bei einer gemessenen Leitfähigkeit von 29,5 mS/cm. Diese entspricht einer NaCl-Konzentration im Elutionspuffer von 274 mM. Der zweite Gipfel eluiert bei 73 mS/cm, während die letzten Proteine in Form einer Schulter bei 91 mS/cm ihre Bindung mit der Heparinsäule kappen. Die Salzkonzentrationen werden somit bei 825 mM für den Peak, sowie 1086 mM für die Schulter gemessen.

Vergleichbar mit den anderen Chromatographie-Schritten, wurde auch nach der Aufreinigung der GPI-gebundenen Chemokin-Analoga eine Western-Blot Analyse der unterschiedlichen

Peak-Fractionen erstellt. Diese sollte erneut die Fraktionen mit dem aufgetrennten RANTES-Antagonisten identifizieren.

Im Durchfluss (A2) findet sich kein im Western-Blot nachweisbares met-RANTES-GPI. Auch wird in den hauptsächlichen Fraktionen des ersten Peaks (B1) und der Schulter des zweiten Gipfels (B7) kein Protein vom anti-RANTES-Antikörper (VL-3-IgG_{2κ}) gefunden. Nur die Fraktionen B2 bis B6, welche mit dem zweiten Peak übereinstimmen, zeigen die Anwesenheit des gesuchten Proteins. Dabei tun sich die Fraktionen B4, B6 und ganz besonders B5 hervor, da auf ihrer Höhe der größte Teil des met-RANTES-GPI Proteins eluiert wird.

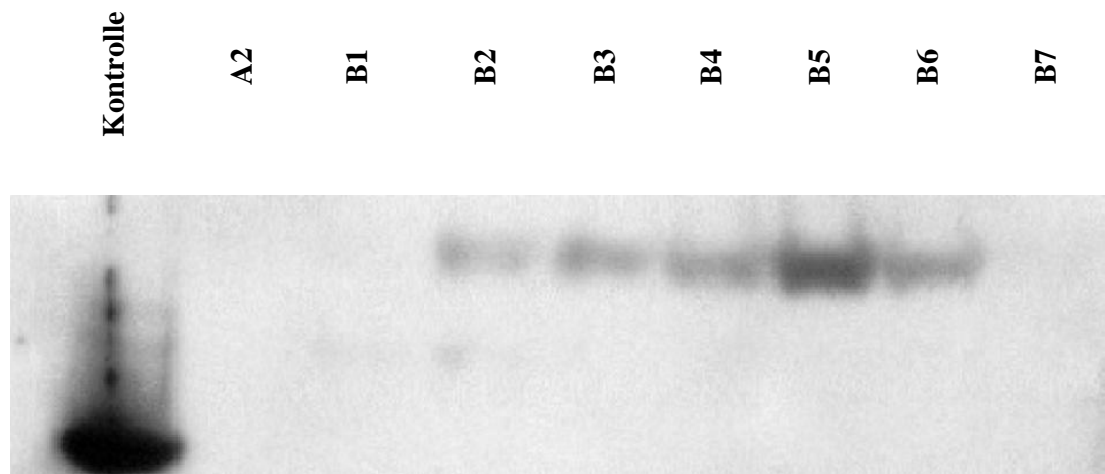


Abbildung 23: Die Fraktionen B2-B6, mit Betonung auf der Fraktion B5, enthalten das gereinigte mRANTES-GPI. In den Fraktionen A2, B1 und B7 (Peak-Schulter) ist es nicht nachweisbar.

Auch hier wurde wiederum ein SDS-Gel mit einfacher Silberfärbung erstellt und mit dem Western-Blot verglichen. Auf mit dem met-RANTES-GPI im Immunoblot vergleichbarer Höhe findet sich eine starke Proteinfraction. Analog zur Ionenchromatographie, finden sich aber noch geringe Verunreinigungen, welche ebenfalls einen weiteren Reinigungsschritt nötig machen.

Zuletzt wurde zur allgemeinen Einschätzung erneut die Integralrechnung zur Berechnung der Fläche der einzelnen Gipfel durchgeführt. Der zweite, met-RANTES-GPI beinhaltende Gipfel kam dabei auf eine „area under the curve“ von 5.300.639 mAU*ml, bei einer Fläche des Durchfluss-Peaks von 17.094.677 mAU*ml. Es wird somit rund dreimal mehr Protein nicht

an die Heparinmatrix gebunden, als sich eluiertes Chemokin wieder findet. Dennoch scheint die Heparin-Chromatographie eine wertvolle Methode der RANTES-Aufreinigung zu sein, da RANTES oder seine Analoga kaum in der Durchfluss-Fraktion wieder zu finden sind. Es wird somit eine gute Ausbeute erreicht. Jedoch bleibt eine gewisse Verunreinigung, die einen zweiten Reinigungsschritt notwendig macht.

Eine Auffälligkeit zeigte sich in der Aufreinigung der unterschiedlichen RANTES-Konstrukte. Für das hRANTES-⁴⁴AANA⁴⁷-GPI wurde eine starke Reduktion der Affinität von RANTES an Glukosaminoglykane beschrieben. Das GPI-gebundene hRANTES-⁴⁴AANA⁴⁷ zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied bei der Aufreinigung mittels Heparin-Chromatographie, bei der ja das bekannteste der Glukosaminoglykane die aktive Gruppe darstellt. Es bleibt also die Frage ungeklärt, ob der kovalent gebundene Glykophosphoinositol-Anker die GAG-bindenden Eigenschaften des hRANTES-⁴⁴AANA⁴⁷-GPI verändert, oder ob die extrem hohen Heparinkonzentrationen der Säulenmatrix andere Bindungseigenschaften mit dem RANTES-Molekül eingehen, die mit *in-vitro* oder *in-vivo* Bedingungen nicht zu vergleichen wären.

Size-exclusion Chromatographie

Die Gelfiltrations- oder „Größen-Ausschluß“-Chromatographie (englisch: Size-exclusion chromatography) stellt eine einfache Methode dar, Moleküle nach Größe aufzutrennen. Wie im Methodenteil schematisch dargestellt, ermöglicht die Matrix eine stärkere Bindung kleinerer Moleküle. Größere Moleküle durchfließen die Säule also schneller als kleine und können so aufgetrennt werden. Wichtig ist dabei, dass das aufzureinigende Protein konzentriert und zeitgleich auf die Gelmatrix trifft. Aus diesem Grund ist der vorhergehende Schritt der Konzentrierung unumgänglich. Des Weiteren kann durch ausführliches Äquilibrieren der Säule ein weiterer Dialyseschritt erspart werden: da die Proteine die Säule schneller durchlaufen, als der Puffer, „wandern“ sie vom „alten“ in den „neuen“ Äquilibrierungspuffer. Da für weitere Versuche ein möglichst einfacher, detergentienarmer Puffer gewünscht ist, wurde in diesem letzten Reinigungsschritt ein PBS-Puffer mit nur 0,025% Triton-X 100 benutzt.

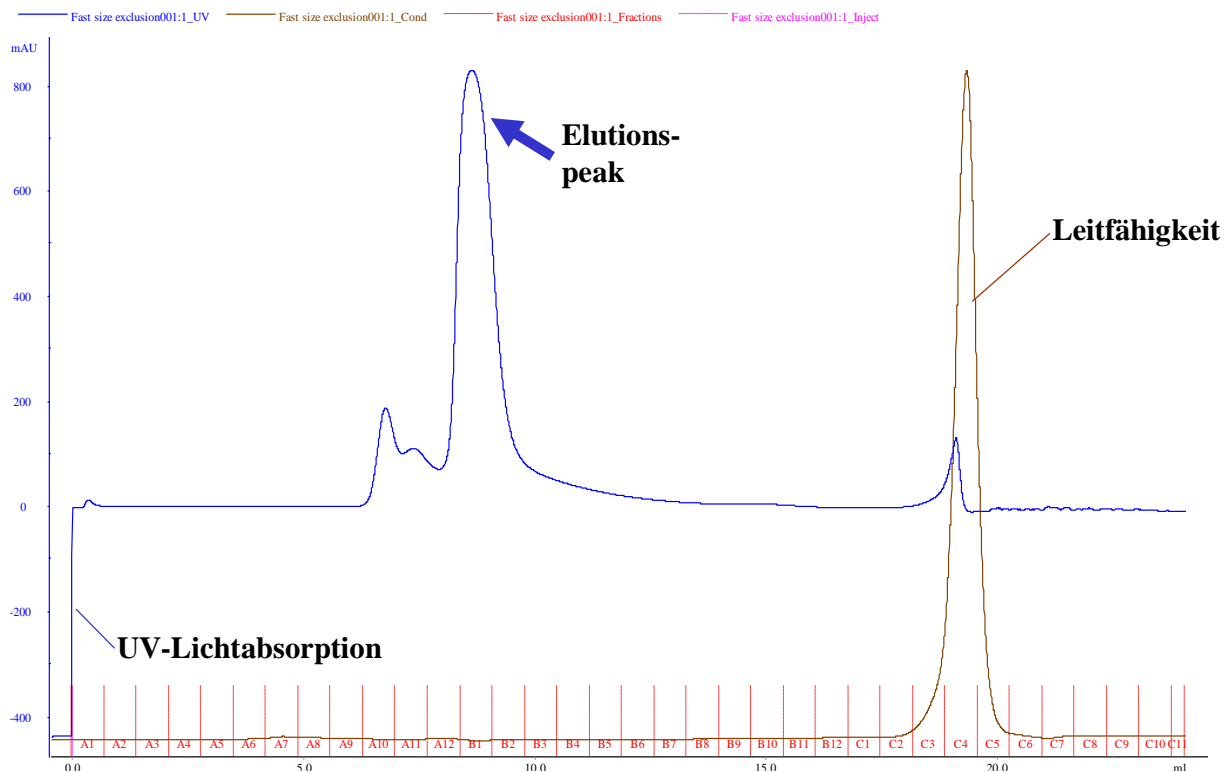


Abbildung 24: Size-exclusion Chromatographie. Neben zwei kleinen Spitzen, findet sich ein Hauptpeak in den Fraktionen A12-B2. mRANTES-GPI wurde zuvor mit Heparin-Säule vor-gereinigt.

Das aus der Heparin-Chromatographie gewonnene RANTES-Analogon wurde auf ein Volumen von 0,3 ml konzentriert und auf die Superdex 75 HR 10/30 Säule der Firma Amersham Biosciences aufgetragen. Die Abbildung 24 zeigt wiederum den Elutionsgraphen. Wie gewohnt zeigt sich die UV-Absorptions-Kurve in Blau, während die Leitfähigkeit und somit gemessene Salzkonzentration in braun dargestellt ist. Neben einem bis 200 mAU ansteigenden spitzen Gipfel mit Schulter in den Fraktionen A9-A11, zeigt sich ein über 800 mAU hoher, von A12 bis B2 reichender Peak, der steil an- und absteigt.

Die nachfolgende Western-Blot-Analyse zeigt, dass sich im Gegensatz zum kleineren Gipfel im grossen Gipfel das GPI-gebundene metRANTES (oder seine Mutanten) wiederfindet. Proben der gereinigten Fraktion wurden ebenfalls – analog zu den vorhergehenden Versuchen – auf ein SDS-Gel aufgetragen und dank Silberfärbung auf Verunreinigung des Eluats überprüft. Unter Berücksichtigung der methodenbedingten Ungenauigkeit konnte das Eluat der Gelfiltrations-Chromatographie nach vorangegangener Heparin-Chromatographie als rein zu bezeichnen .

Die Abbildung 24 zeigt des Weiteren einen spät (bei 18-20 ml nach Auftrag des Proteins) auftretenden steilen Anstieg der Salzkonzentration, sowie einen kleinen peak in der UV-Absorption. Dieses Phänomen kann als später Durchfluss des aus der Heparin-

Chromatographie stammenden Elutionspuffers gelten. Dieser ist mit 100mM NaCl, 10mM NaPi und 0,1% Triton X-100 deutlich Salz- und Detergens-reicher und erklärt diesen späten Anstieg der Leitfähigkeit und UV-Absorption.

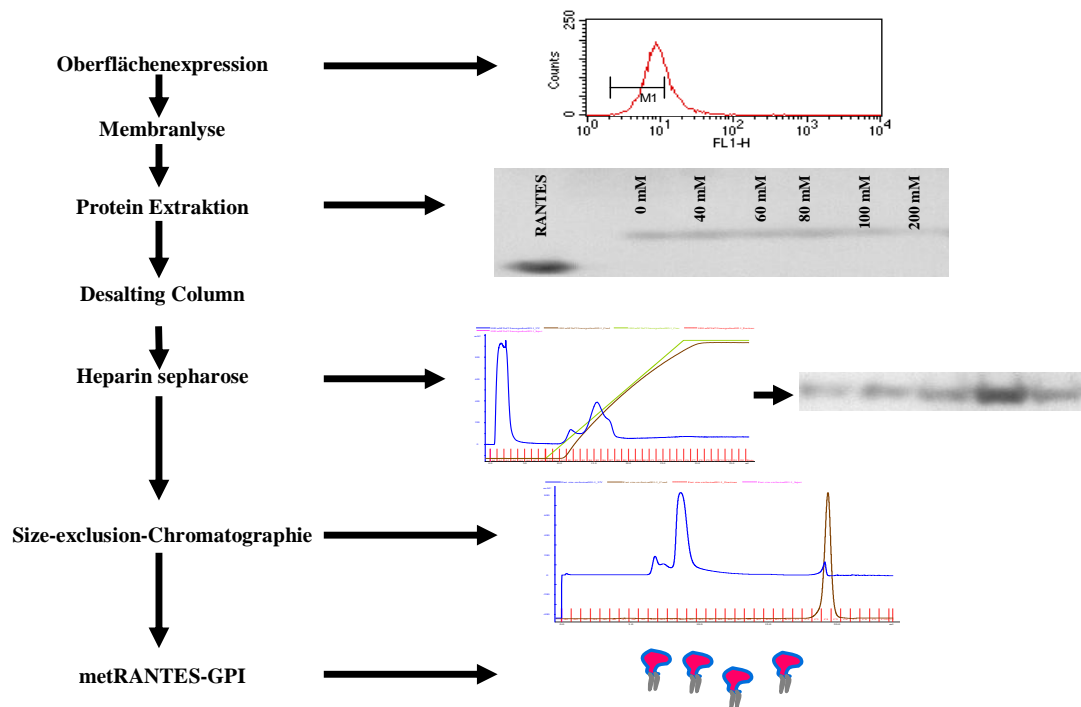


Abbildung 25: Schema über das Protokoll zur Aufreinigung von GPI-gebundenen Chemokinrezeptor-Antagonisten.

Die Abbildung 25 zeigt schematisch das zur Aufreinigung der GPI-gebundenen Chemokin-Analoga benutzte Protokoll. Nach erfolgreicher Kontrolle der Oberflächenexpression des von CHO-Zellen produzierten Proteins, werden die Membranen lysiert und das Protein mittels detergentien-haltigem Puffer aus den Membranen extrahiert. Das im Folgenden dialysierte Produkt wird in einem ersten Chromatographie Schritt dank der Heparinsepharose aufgereinigt. Daraufhin wird das Eluat konzentriert und in einem letzten Schritt mit Gelfiltrations- oder Size-exclusion-Chromatographie von den letzten Verunreinigungen befreit. Der letzte Schritt erlaubte es auch, die Konzentration des Detergens (hier Triton X-100) stark zu reduzieren. Das somit aufgereinigte, GPI-verbundene RANTES-Konstrukt stand somit für nachfolgende *in-vitro* und *in-vivo* Versuche zur Verfügung.

GPI-verankertes virales Makrophageninhibitorisches Protein II (vMIP-GPI)

Um sich die virale „mimickry“ genannte Chemokinbiologie zugunsten einer humoralen Immunantwort zunutze zu machen, wurde das virale Makrophagen Inhibitorische Protein II (vMIP-II) ebenfalls mit dem GPI-Anker fusioniert. Dabei wurde wie oben beschrieben, dank der XbaI-Schnittstelle und dem mutierten Stoppkodon, das virale Chemokin C-terminal mit der GPI-Signalsequenz ligiert. Dank des sense-Primers 5'-CGGCGGGCGGAATTCGGACACACGAG-3' und des antisense-Primers 5'-CGCGGCGCCTCTAGA-GCGAGCAGTGAAGT-3' konnte der virale Immunmodulator mit der GPI-Signalsequenz verbunden und in den Transfektionsvektor kloniert werden.

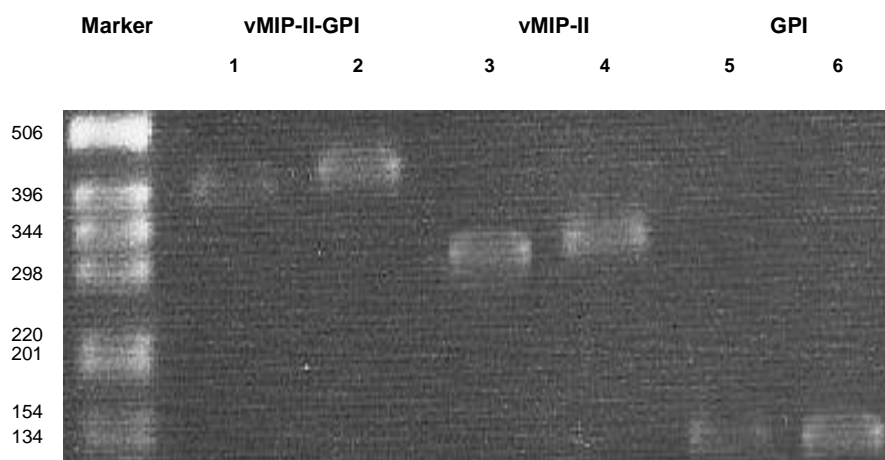


Abbildung 26: Diagnostischer Verdau des vMIP-II-GPI Konstruktes im pUC-Vektor. Verdau mit *EcoRI* / *Sal I* (Spalten 1 + 2) ergibt das 365 bp grosse vMIP-II-GPI, Verdau mit *EcoRI* / *Xba I* (Spalten 3 + 4) das vMIP-II-Molekül (310 bp) und Verdau mit *EcoRI* / *Xba I* (Spalten 5 + 6) die 55 bp grosse GPI-Signalsequenz.

Abbildung 26 zeigt den diagnostischen Verdau nach Subklonieren in den pUC-Vektor. Je nach Schnittstelle kommen dabei die kodierenden Sequenzen für das vMIP-II-GPI, das vMIP-II oder die GPI-Sequenz zum Vorschein. Analog zu oben beschriebenen Verfahren wurden DHFR-defiziente, sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche, Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO/dhfr⁻) mit dem vMIP-II-GPI Vektor stabil transfiziert und in einem Selektionsmedium inkubiert. Nachdem wiederum nur die CHO-Zellen, die den pEF-Vektor integriert hatten, ausselektiert worden waren, wurde die Oberflächenexpression mittels FACS-Analyse untersucht. Es wurde als Primärantikörper der polyklonale anti-vMIP-II Ziegen-Antikörper benutzt. Im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle konnte auch hier eine signifikant

erhöhte Oberflächenexpression gefunden werden. Somit stehen vMIP-II-GPI stabil exprimierende CHO-Zellen zur Verfügung.

Im Weiteren musste auf die folgenden Aufreinigungsschritte verzichtet werden, da uns für Westernblot und ELISA passende (monoklonale) anti-vMIP-II Antikörperreagentien nicht zur Verfügung standen.

In-vitro Versuche

Die aufgereinigten CCL5-Analoga konnten für weitere Versuche verwendet werden. Zunächst einmal musste die effiziente Reinkorporation nachgewiesen werden.

Reinkorporation von met-RANTES-GPI in CHO-Zellen

Wie im Methodenabschnitt beschrieben, wurde in einem ersten in-vitro Versuch (in Kooperation mit M. Notohamiprodjo) die Fähigkeit von GPI-gekoppelten Chemokin-Analoga getestet, erfolgreich in die Einheitsmembran integriert zu werden.

Dazu wurden nicht-transfizierte CHO-Zellen benutzt. Diese wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von gereinigtem met-RANTES-GPI inkubiert und zur Oberflächenanalyse gegeben. Es wurde ein anti-RANTES-Antikörper als primärer Antikörper und ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper benutzt.

Die Zellzahl der RANTES-positiven Zellen wurde, nach oben beschriebenem Protokoll, mittels Fluss-zytometer (FACS-Analyse) ermittelt und mit einer Kontrolle verglichen. Eine im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle bestehende Rechtsverschiebung gibt ein verstärktes Fluoreszenz-Signal an, bzw. eine größere Anzahl Zellen an deren Oberfläche ein Primärantikörper gebunden ist.

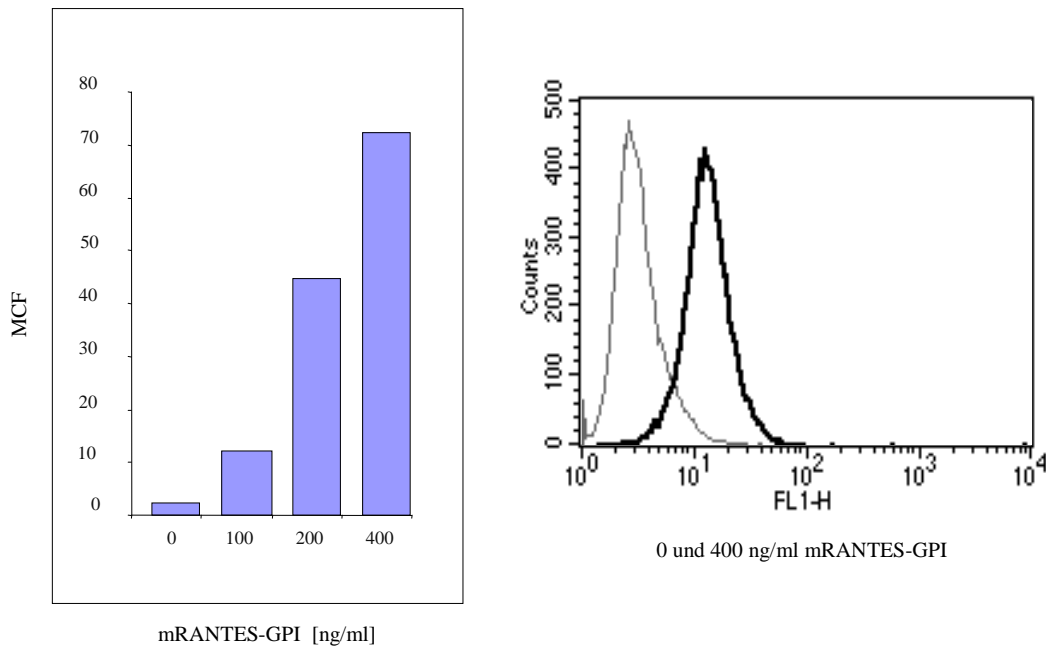


Abbildung 27: Reinkorporation von mRANTES-GPI in nicht transfizierte CHO-Zellen. Links zeigt die Grafik die konzentrationsabhängige mRANTES-positive Zellzahl in der FACS-Analyse. Rechts deutet die dunkle Kurve eine deutliche Steigung mRANTES-positiver CHO-Zellen an. Die Reinkorporation von mRANTES-GPI ist somit bewiesen (in Kooperation mit M. Notohamiprodjo).

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass sich das mutierte RANTES/CCL5 dank seines C-terminalen GPI-Ankers in „leere“ Oberflächenmembranen wieder reintegrieren lässt. Die mit dem GPI-Chemokin inkubierten Zellen präsentieren, trotz mehrfacher Waschschrte, dieses Protein an ihrer Membran und geben ein verstärktes Fluoreszenz-Signal wieder. Die rechte Abbildung zeigt eine Rechtsverschiebung (dunkle Kurve) im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle. Des Weiteren kann als bedeutsames Ergebnis festgehalten werden, dass diese Reinkorporation der GPI-gekoppelten RANTES-Analoga ein konzentrationsabhängiger Schritt ist. Die linke Grafik, in der die durchschnittlich gemessene Fluoreszenz (mean channel fluorescence) je nach met-RANTES-GPI Konzentration gemessen wird, zeigt eine deutliche Steigerung der gemessenen Fluoreszenz zwischen den in niedriger Konzentration (100µg/ml) inkubierten CHO-Zellen und denen in höherer Konzentration (400µg/ml).

Reinkorporation von met-RANTES-GPI in HuMVEC-Zellen

In einem nächsten Schritt wurde die Reinkorporation des GPI-verankerten Chemokinrezeptor-Antagonisten in humane mikrovaskuläre Endothelzellen überprüft (in Kooperation mit M. Notohamiprodjo). Dabei wurden, in einem ersten Schritt und analog zu oben beschriebenem Versuch, ansteigende Konzentrationen des GPI-verankerten Agens mit HuMVEC-Zellen inkubiert und nach mehreren Waschschrten per FACS-Analyse untersucht. Gleichzeitig

wurde mit einem RANTES-spezifischem ELISA die Menge des in der Waschlösung befindlichen metRANTES analysiert. In einem zweiten Schritt wurde, nach Reinkorporation von 700 ng/ml des Chemokinrezeptor-Antagonisten in HuMVEC-Zellen, die GPI-Verankerung mittels 120 ng/ml Phospholipase C gespalten. Die Zellen wurden erneut gewaschen und das solubilisierte metRANTES per ELISA gemessen. Nach der ersten Methode konnte eine Effizienz der Reinkorporation von 52% des Ursprungsmaterials gemessen werden. Nach dem PLC-Verdau wurden 24% des ursprünglich eingesetzten Proteins im Überstand gemessen. Auf diesen zwei Ansätzen basierend kann man davon ausgehen, dass zwischen 25% und 50% des anfänglich benutzten Materials in die Oberflächenmembran der humanen Endothelzellen reintegriert wird. Dies entspricht einer Effizienz die mit der Effizienz anderer GPI-verankerter Proteine vergleichbar ist (Djafarzadeh, Noessner et al. 2006).

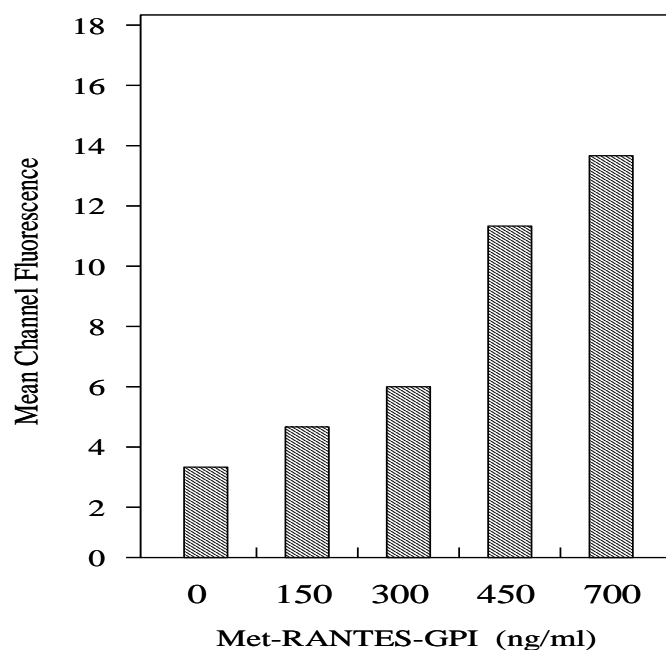


Abbildung 28: Reinkorporation von mRANTES-GPI in HuMVEC-Zellen. Die Grafik zeigt die konzentrationsabhängige mRANTES-positive Zellzahl in der FACS-Analyse. Somit ist die Reinkorporation von mRANTES-GPI auch in Endothelzellen konzentrationsabhängig (in Kooperation mit M. Notohamiprodjo).

Abbildung 28 zeigt, dass die Reinkorporation der GPI-verankerten Chemokine auch in humanen mikrovaskulären Endothelzellen konzentrationsabhängig ist. Es konnte somit bewiesen werden, dass die Reintegration an die Oberflächenmembran der Zielzellen möglich ist.

VI DISKUSSION

Chemokinrezeptoren und ihre Liganden spielen in einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Vorgänge im Immunsystem eine herausragende Rolle (Segerer, Nelson et al. 2000; Nelson and Krensky 2001; Weber and Koenen 2006). Sie nehmen dabei eine Schlüsselstelle zu Beginn inflammatorischer Prozesse ein und sind daher von therapeutischem Interesse. Die Zahl der bekannten Chemokine und ihrer Rezeptoren ist in den vergangenen Jahren ständig gewachsen (Nelson and Krensky 2001). Diese Entwicklung ist sicherlich noch nicht abgeschlossen und lässt die Komplexität der möglichen Wechselwirkungen in diesem Regulationssystem nur erahnen.

Nach wie vor ist die chemotaktische Wirkung die herausragende Eigenschaft der Chemokine. Durch Chemotaxis wird die gezielte Auswanderung bestimmter Zellpopulationen aus dem peripheren Blut an den Ort des Geschehens ins Gewebe geregelt (Springer, 1994). Dieser Vorgang ist absolute Voraussetzung für die Entstehung einer effektiven Immunantwort. CCL5/RANTES ist einer der bekanntesten Vertreter aus der Familie der Chemokine. Es wirkt mittels der Interaktion mit seinen Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 chemotaktisch auf T-Lymphocyten, NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Basophile und Eosinophile und ist damit an mehreren Punkten in die Steuerung des Immunsystems eingebunden. CCL5 kann in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und unterliegt dabei einer Zelltyp- und Stimulus-spezifischen Kontrolle.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits detaillierte Kenntnisse über die Kapazität von metRANTES vor, die Wirkung der CC-Chemokinrezeptoren 1 und 5 auf die feste Adhäsion zu antagonisieren (Grone, Weber et al. 1999). In dieser Arbeit ist unter physiologischen Flussbedingungen die feste Adhäsion von MonoMac 6 – Monozyten auf aktiviertes Endothel mittels metRANTES erfolgreich reduziert worden. Auf die nachfolgenden Schritte in der Diapedese – dem „spreading“ und der Transmigration – haben weder CCL5 noch sein Antagonist metRANTES einen bedeutenden Einfluss.

Das Endothelium eines transplantierten Organs spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung einer akuten Abstoßungsreaktion. Dabei ist RANTES/CCL5 als proinflammatorisches Chemokin maßgeblich mitbeteiligt. Durch Antagonisierung der endothelialen Transmigration von aktivierten Leukozyten, die durch CCL5 und seine Rezeptoren mediiert wird, kann die akute Abstoßungsreaktion im Rattenmodell der renalen Transplantation reduziert und abgemildert werden (Grone, Weber et al. 1999). Dabei werden transplantierte Tiere systemisch mit dem CCL5 Antagonisten met-RANTES behandelt. Met-RANTES entwickelt eine blockierende Aktivität gegen die Rezeptoren CCR1 und CCR5. Es schwächt somit die

Wirkung der Liganden CCL5, MIP-1 α , MCP-3, HCC-1, MIPF-1, MIP-5, LKN-1, MIP-1 δ (CCR1) und RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , HCC-1 (CCR5) (Proudfoot, Power et al. 1996; Kledal, Rosenkilde et al. 1997; Nelson and Krensky 1998).

Die systemische Behandlung mit einem rekombinanten Protein ist mit hohen Kosten verbunden. So muss zum Beispiel der RANTES-basierte Antagonist met-RANTES in Transplantationsexperimenten täglich über eine längere Zeitspanne verabreicht werden, um biologische Effekte hervorzurufen (Grone, Weber et al. 1999). Ausserdem können hohe Konzentrationen an zirkulierenden rekombinanten Proteinen starke Nebenwirkungen auf andere Organsysteme haben. Um diesen Problemen entgegenzutreten, wurde in dieser Arbeit ein Chemokin-basiertes Reagens entwickelt, von welchem zu erwarten war, dass es sich in die endothelialen Oberflächen der transplantierten Organe integrieren könnte. Durch Pre-perfusion des Transplantats, könnte das Organ kurz vor der Transplantation behandelt werden. Dabei wäre die lokale Beschränkung auf das Transplantat von großem Vorteil.

In der vorliegenden Arbeit wurde das N-terminal um ein Methionin verlängertes CCL5 mit einem Glykophosphatidylinositol (GPI) Anker fusioniert. Das „protein engineering“ genannte Verbinden eines Proteins mit einem GPI-Anker bietet die Möglichkeit, durch Reintegration in die Oberflächenmembranen unterschiedlicher Gewebe, Proteine an definierte Lokalisationen zu bringen. Dort können sie, dank der Fähigkeit, sich in die Membranen anderer Zellen zu reintegrieren und die ursprüngliche Funktion wieder anzunehmen (Premkumar, Fukuoka et al. 2001; Djafarzadeh, Noessner et al. 2006), längere Zeit als soluble Chemokine wirken. GPI-gekoppelte Chemokine könnten dabei eine neue Rolle in der Immunmodulation der endothelialen Transmigration spielen, da Endothelien zum Einen leicht zugängliche Gewebe (z.B. durch Pre-perfusion eines Transplantatorgans) und gleichzeitig auch der natürliche Wirkungsort chemotaktischer Zytokine sind.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, Chemokinrezeptor-Antagonisten, die um eine GPI-kodierende Sequenz erweitert wurden, in einen Expressionsvektor zu subklonieren und mittels Transformation in Chinese Hamster Ovarial-Zellen (CHO-Zellen) zu exprimieren. Diese Membran-Verankerten Proteine wurden aus der Einheitsmembran extrahiert und in einem weiteren Schritt durch verschiedene Chromatographieverfahren isoliert. Nachdem die Reinkorporation in fremde Zelloberflächen gesichert war, standen die GPI-Gekoppelten Proteine für immunmodulatorische Studien zur Verfügung.

Protein-engineering und Oberflächenexpression

Da die Fusion des RANTES/CCL5 mit einem Glykophosphatidylinositol-Anker noch nicht beschrieben war, war es - besonders in Hinblick auf die geplanten *in-vivo* Versuche der Nierentransplantation am Rattenmodell - notwendig, sich die bekannten Eigenschaften der RANTES/CCL5-Mutationen (Appay, Brown et al. 1999; Proudfoot, Fritchley et al. 2001) zunutze zu machen, um eventuellen unerwünschten Effekten der Fusion des CCL5 mit dem GPI-Anker begegnen zu können.

So tendiert solubles RANTES dazu, hochmolekular zu aggregieren. GPI-verankertes RANTES wird aber nicht über elektrostatische Wechselwirkungen mit den GAG-Gruppen gebunden, sondern integriert sich mit seinem Lipidanker in die endotheliale Membran. Dabei könnte die Tendenz, zu multimerisieren, potentiell negative Wirkungen auf die Mobilität des Moleküls innerhalb der Einheitsmembran, beziehungsweise auf die Verteilung auf das gesamte Endothel während der Pre-perfusion des Transplantats haben. Für diesen Fall standen die an der 26. oder 66. Aminosäure mutierten Chemokin-analoga zur Verfügung, die, wie oben beschrieben, als Tetra- oder Dimer auftreten. Zudem hat sich herausgestellt, dass sich die natürliche hochmolekulare Oligomerisierung essentiell für die CCR1-medierte Adhäsion der Leukozyten ist (Baltus, Weber et al. 2003). Unter Flussbedingungen zeigt sich, dass die CCL5-Mutanten, die in dieser Oligomerisierung defizient sind, die RANTES-induzierte Rekrutierung von Monozyten und CD45RO⁺ CD4⁺ T Zellen blockieren (Baltus, Weber et al. 2003). Somit ist die Di- und Tetramerisierung für sich betrachtet ein antagonisierender Faktor der Leukozytenadhäsion.

Desweiteren stellte sich das Problem der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem CCL5-Derivat und den oberflächlichen Glukosaminoglykanen. Da die Chemokin-analoga nun mit einem GPI-Anker fusioniert waren, konnten sie in die Endothelmembran integriert werden. Allerdings könnte es mit den GAGs zu verstärkten Bindungen über die hochaffine GAG-bindende Domäne kommen. Da dadurch für die vorbeie rollenden Leukozyten die Präsentation des CCL5-Antagonisten verändert sein könnte, liess sich eine Funktionsveränderung bzw. -abschwächung nicht ausschliessen. Die Veränderung an drei Aminosäuren und der damit verbundene Verlust der GAG-Bindefähigkeit des metRANTES^(44AANA⁴⁷)-GPI könnte in einem solchen Fall eine einfache Lösungsmöglichkeit darstellen.

Das virale Makrophagen Inflammatorische Protein (vMIP-II) ist dank der Blockade der Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 und CXCR4 ein potenter Antagonist der Chemokine CCL3, CCL4, CCL5 und CX3CL1 (Kledal, Rosenkilde et al. 1997). Desweiteren ist vMIP-II ein Agonist am Chemokin-Rezeptor CCR8, der auf Th2-Zellen gefunden wird. Unter Flussbedingungen kann es die feste Adhäsion von Monozyten und Th1-Zellen an aktiviertes Endothelium inhibieren, und die Adhäsion von Eosinophilen und Th2-Zellen induzieren (von Hundelshausen, Weber et al. 2001). Dadurch verschiebt sich das Th1-/Th2-Zellen Gleichgewicht von einer zytotoxischen Antwort in Richtung einer humoralen Reaktion. Die neuen immunmodulatorischen Eigenschaften dieses anti-inflammatorischen Chemokins konnten schon in-vivo unter Beweis gestellt werden (Chen, Bacon et al. 1998).

Nach Subklonieren in den pUC-Vektor und Verbinden mit einem Lipidanker, konnte ich das GPI-gebundene vMIP-II stabil über den pEF-Vektor in Chinese Hamster Ovary Zellen transfizieren und von diesen an der Zelloberfläche exprimieren lassen. Aufgrund nicht zur Verfügung stehender Antikörperreagentien musste auf eine weitere Aufreinigung verzichtet werden. Das von CHO-Zellen exprimierte vMIP-II-GPI wird, sobald eine Aufreinigung möglich sein wird, eine neue Generation kraftvoller immunmodulatorischer Agentien darstellen. Von Hundelshausen und Kollegen wiesen nach, dass es mittels viraler „mimickry“ nicht nur pro-inflammatorische Chemokin-Rezeptoren antagonisiert, sondern auch die Th1-/Th2-Zell Balance zu einer humoralen Antwort tendieren läßt (von Hundelshausen, Weber et al. 2001).

Das erfolgreiche Subklonieren der RANTES/CCL5-Mutanten und das anschliessende Fusionieren dieser vier CCL5-Analoga, sowie des vMIP-II mit einem GPI-Anker eröffnen eine Vielzahl an Möglichkeiten, immunmodulatorisch in die Transplantatabstoßung einzugreifen.

Protein-Isolierung

Nach der Extraktion der GPI-gebundenen Chemokinrezeptorantagonisten aus der CHO-Membran, wurden sie mittels verschiedener Chromatographietechniken aufgereinigt, gefolgt von Western Blot Analysen mit dem VL1 anti-CCL5 Antikörper (von Luettichau, Nelson et al. 1996) und SDS-Silberfärbung.

Dabei stellte sich die sehr aufwendige Methode der Immunoaffinitäts-Chromatographie als kaum praktikabel heraus. Sie ist zwar dank des VL3 anti-RANTES Antikörper (von Luettichau, Nelson et al. 1996) sehr spezifisch und erzeugt somit eine hohe Reinheit. Die

Ausbeute war jedoch überhaupt nicht zufrieden stellend. Im Gegensatz dazu zeigten sich die drei anderen Methoden als sehr nützlich. Die Heparin-Chromatographie und die Kationenaustauscher-Chromatographie waren in ihrem Reinheitsgrad und ihrer Ausbeute durchaus vergleichbar. Die Gelfiltrations- oder „Size-exclusion“-Chromatographie bot sich aufgrund des Konzentrationsschritts vor dem Proteinauftrag nur als letzte Methode für bereits vorgereinigte Proteine an. Die Heparin-Chromatographie gekoppelt mit einer Size-exclusion Chromatographie wurde als Methode mit der besten Reinheit und Ausbeute identifiziert.

Die so aufgereinigten, mit GPI verankerten Chemokinrezeptor-Antagonisten standen nach diesen FPLC-gesteuerten Chromatographieschritten für weitere *in-vitro* und *in-vivo* Versuche zur Verfügung.

Reintegration

Zuerst sollte das Prinzip der Reintegration der GPI-verankerten CCL5-Mutanten in Oberflächenmembranen bewiesen werden. Mit dem oben beschriebenen Versuch konnte dieser Beweis erbracht werden, da die mit met-RANTES-GPI inkubierten CHO-Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine konzentrationsabhängige Verstärkung des Floreszenz-Signals zeigten.

In einem nächsten Versuch mit met-RANTES-GPI konnte gezeigt werden, dass die Reinkorporation des gereinigten Proteins in humanen Mikrovaskulären Endothelialzellen (HuMVEC) vergleichbar mit der oben erwähnten Reintegration in CHO-Zellmembranen gelingt und dieser Effekt ebenfalls dosisabhängig ist. Dies ist insbesondere wichtig, da in den geplanten *in-vivo* Versuchen, das renale Endothel das Zielorgan für die therapeutische Anwendung der generierten GPI-verankerten Proteine darstellt. Auch wurde mittels ELISA die Effektivität der Inkorporation in die Membranen gemessen. Dabei zeigte sich, dass zwischen 25 und 50% der Ursprungsmenge des Proteins in die Membranen integriert wird. Dies entspricht anderen Berechnungen für GPI-verankerte Proteine (Djafarzadeh, Mojaat et al. 2004).

Ausblick

In fortführenden *in-vitro* Versuchen konnte die Funktionalität des reintegrierten met-RANTES-GPI (in seiner dimerisierenden Form) in einem transendothelialen Migrationsversuch untersucht werden. Dabei wurde eine modifizierte Boyden Flusskammer

mit primären HuMVEC Zellen (von Hundelshausen, Weber et al. 2001) benutzt. Nachdem die optimale migrationsinduzierende CCL5 Konzentration bestimmt worden war, wurden die Endothelialzellen mit 100 ng/ml met-RANTES(E26A)-GPI inkubiert. Dies konnte die endotheliale Transmigration effektiv reduzieren. Während das Chemokin CCL5 im Vergleich zur Kontrolle die Migration um fast das Doppelte erhöhte, konnte der Einsatz des GPI-verbundenen Antagonisten eine Migration auf rund die Hälfte der Kontrolle reduzieren. Diese Versuchsreihe beweist somit, dass sich die Chemokin Rezeptorantagonisten neben den CHO-Zellen auch in endotheliale Zellen inkorporieren lassen und dort auch die zu erwartende Wirkung entfalten (Notohamiprodjo, Djafarzadeh et al. 2005).

Meine Arbeit hat gezeigt, dass die Generierung eines GPI-verbundenen, CCL5-basierten Chemokin Rezeptorantagonisten möglich ist. Dieser wird von stabil transfizierten CHO-Zellen produziert und kann mit Hilfe einer Folge von Chromatographieschritten aufgereinigt werden. Die Reinkorporation in Oberflächenmembranen ist prinzipiell möglich. Die GPI-gekoppelten Chemokin Rezeptorantagonisten stellen somit ein leistungsfähiges Instrument dar, mit dem Transplantatorgane kurz vor ihrer Implantation perfundiert werden könnten. Es wird erwartet, dass sich met-RANTES so in die mikrovaskulären, endothelialen Zellmembranen integriert und dort, wie schon beschrieben, den akuten Gewebeschaden supprimiert (Grone, Weber et al. 1999; Bedke, Stojanovic et al. 2002; Song, Zou et al. 2002; Yun, Whiting et al. 2004). Eine *in-vivo* Versuchsreihe der murinen Nierentransplantation ist zurzeit im Gange.

In dieser Arbeit wurden Alternativen gesucht, um die recht komplizierte Immunmodulation zur Behandlung der Transplantatabstoßung (Grone, Weber et al. 1999; Song, Zou et al. 2002) zu vereinfachen. Es wurde dabei ein Ansatz gesucht, der eine lokal begrenzte Immunmodulation gewährleisten kann. Daher wurde auf die zuvor „cell painting“ beschriebene Methode (Medof, Nagarajan et al. 1996; Djafarzadeh, Mojaat et al. 2004) zurückgegriffen, bei der GPI-verankerte Proteine nach ihrer Aufreinigung, in Oberflächenmembranen reintegriert werden. Nach dieser Inkorporation können sie ihre ursprüngliche Aktivität ausüben. Jenseits der hier benutzten CCR1 und CCR5 Rezeptorantagonisten, bietet diese Methode eine elegante Möglichkeit, mittels GPI-gekoppelter Chemokinagonisten und –antagonisten auf einzelne Organe immunmodulierend einzugreifen.

VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CCR	„CC-chemokine receptor“
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	„CAAT enhancer binding protein“
CsCl	Cäsiumchlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	Tetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
FLAT	„factor of late activated T cells“
G	Guanosin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GPI	Glukophosphoinositolphosphat
h	Stunde
HIV-1	„human immunodeficiency virus-1“
IFN γ	Interferon gamma
IHMC	Immortalisierte Humane Mesangialzelllinie
IL	Interleukin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Ktrl.	Kontrolle
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMP-Agarose	„low melting point“-Agarose
LPS	Lipopolysaccharid (gram-negativer Bakterien)
M	Molar (mol pro Liter)
m	milli
μ	mikro (10^{-6})
MCF	mean channel of fluorescence
MCP-1	„monocyte chemoattractant protein-1“
min	Minute
MIP-1	„macrophage inhibiting protein 1“
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulphonsäure
MWCO	molecular weight cut off
MW	Molekulargewicht
n	nano (10^{-9})

NK-Zelle	„natural killer cell“
NLS	„nuclear localization signal“
NP40	Nonidet P-40
p	piko (10^{-12})
PBS	Phosphat gepufferte Saline
RANTES	„regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted“
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP1	„stimulating protein 1“
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Ajuebor, M. N., Z. Wondimu, et al. (2007). "CCR5 deficiency drives enhanced natural killer cell trafficking to and activation within the liver in murine T cell-mediated hepatitis." Am J Pathol **170**(6): 1975-88.
- Alam, R., S. Stafford, et al. (1993). "RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils." J Immunol **150**(8 Pt 1): 3442-8.
- Ambrosio, G. and I. Tritto (1999). "Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications." Am Heart J **138**(2 Pt 2): S69-75.
- Appay, V., A. Brown, et al. (1999). "Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties. Characterization of nonaggregating, noninflammatory RANTES mutants." J Biol Chem **274**(39): 27505-12.
- Arenzana-Seisdedos, F., J. L. Virelizier, et al. (1996). "HIV blocked by chemokine antagonist." Nature **383**(6599): 400.
- Bacon, K. B., L. Flores-Romo, et al. (1994). "Interleukin-8 and RANTES induce the adhesion of the human basophilic cell line KU-812 to human endothelial cell monolayers." Immunology **82**(3): 473-81.
- Bacon, K. B., B. A. Premack, et al. (1995). "Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES." Science **269**(5231): 1727-30.
- Baltus, T., K. S. Weber, et al. (2003). "Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium." Blood **102**(6): 1985-8.
- Bedke, J., T. Stojanovic, et al. (2002). "Met-RANTES improves acute-rejection-induced microvascular injury in rat small bowel transplantation." Transplant Proc **34**(3): 1049.
- Brodsky, R. A., S. M. Jane, et al. (1994). "Purified GPI-anchored CD4DAF as a receptor for HIV-mediated gene transfer." Hum Gene Ther **5**(10): 1231-9.
- Brunschwig, E. B., J. D. Fayen, et al. (1999). "Protein transfer of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-modified murine B7-1 and B7-2 costimulators." J Immunother **22**(5): 390-400.
- Bulow, R., P. Overath, et al. (1988). "Rapid lateral diffusion of the variant surface glycoprotein in the coat of *Trypanosoma brucei*." Biochemistry **27**(7): 2384-8.
- Butcher, E. C. (1991). "Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity." Cell **67**(6): 1033-6.
- Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." Science **272**(5258): 60-6.
- Campbell, J. J. and E. C. Butcher (2000). "Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing." Curr Opin Immunol **12**(3): 336-41.
- Campbell, J. J., E. F. Foxman, et al. (1997). "Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration." Eur J Immunol **27**(10): 2571-8.
- Chen, S., K. B. Bacon, et al. (1998). "In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II." J Exp Med **188**(1): 193-8.
- Chihara, J., N. Hayashi, et al. (1994). "RANTES augments radical oxygen products from eosinophils." Int Arch Allergy Immunol **104 Suppl 1**(1): 52-3.
- Culley, F. J., A. M. Pennycook, et al. (2006). "Role of CCL5 (RANTES) in viral lung disease." J Virol **80**(16): 8151-7.

- Czaplewski, L. G., J. McKeating, et al. (1999). "Identification of amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES. Characterization of active disaggregated chemokine variants." *J Biol Chem* **274**(23): 16077-84.
- Djafarzadeh, R., A. Mojaat, et al. (2004). "Exogenously added GPI-anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) displays enhanced and novel biological activities." *Biol Chem* **385**(7): 655-63.
- Djafarzadeh, R., E. Noessner, et al. (2006). "GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing." *Oncogene* **25**(10): 1496-508.
- Englund, P. T. (1993). "The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors." *Annu Rev Biochem* **62**: 121-38.
- Fischereder, M., B. Luckow, et al. (2001). "CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival." *Lancet* **357**(9270): 1758-61.
- Gerber, L. D., K. Kodukula, et al. (1992). "Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide." *J Biol Chem* **267**(17): 12168-73.
- Grone, H. J., C. Weber, et al. (1999). "Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment." *Faseb J* **13**(11): 1371-83.
- Hancock, W. W., W. Gao, et al. (2000). "Chemokines and their receptors in allograft rejection." *Curr Opin Immunol* **12**(5): 511-6.
- Horta, M. F., F. J. Ramalho-Pinto, et al. (1991). "Role of human decay-accelerating factor in the evasion of *Schistosoma mansoni* from the complement-mediated killing in vitro." *J Exp Med* **174**(6): 1399-406.
- Huang, J. H., R. R. Getty, et al. (1994). "Protein transfer of preformed MHC-peptide complexes sensitizes target cells to T cell cytotoxicity." *Immunity* **1**(7): 607-13.
- Ishihara, A., Y. Hou, et al. (1987). "The Thy-1 antigen exhibits rapid lateral diffusion in the plasma membrane of rodent lymphoid cells and fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(5): 1290-3.
- Kameyoshi, Y., A. Dorschner, et al. (1992). "Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils." *J Exp Med* **176**(2): 587-92.
- Kapp, A., G. Zeck-Kapp, et al. (1994). "The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF." *J Invest Dermatol* **102**(6): 906-14.
- Kirby, A. C., V. Hill, et al. (1995). "LFA-3 delta D2: a novel in vivo isoform of lymphocyte function-associated antigen 3." *Biochem Biophys Res Commun* **214**(1): 200-5.
- Kledal, T. N., M. M. Rosenkilde, et al. (1997). "A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Science* **277**(5332): 1656-9.
- Kooyman, D. L., G. W. Byrne, et al. (1995). "In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium." *Science* **269**(5220): 89-92.
- Kucuk, C., E. Sozuer, et al. (2006). "Treatment with Met-RANTES decreases bacterial translocation in experimental colitis." *Am J Surg* **191**(1): 77-83.
- Lim, J. K., J. M. Burns, et al. (2005). "Multiple pathways of amino terminal processing produce two truncated variants of RANTES/CCL5." *J Leukoc Biol* **78**(2): 442-52.
- Lindow, M., H. R. Luttichau, et al. (2003). "Viral leads for chemokine-modulatory drugs." *Trends Pharmacol Sci* **24**(3): 126-30.
- Longden, J., E. L. Cooke, et al. (2008). "Effect of CCR5 receptor antagonists on endocytosis of the human CCR5 receptor in CHO-K1 cells." *Br J Pharmacol*.

- Mack, M., G. Riethmuller, et al. (1995). "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7021-5.
- Maghazachi, A. A., A. al-Aoukaty, et al. (1994). "C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins." J Immunol **153**(11): 4969-77.
- McConville, M. J. and M. A. Ferguson (1993). "The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes." Biochem J **294** (Pt 2): 305-24.
- McHugh, R. S., S. N. Ahmed, et al. (1995). "Construction, purification, and functional incorporation on tumor cells of glycolipid-anchored human B7-1 (CD80)." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 8059-63.
- McPherson, M. J. (1991). Directed mutagenesis : a practical approach. Oxford [England] ; New York, IRL Press ; New York : Oxford University Press.
- Medof, M. E., S. Nagarajan, et al. (1996). "Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins." Faseb J **10**(5): 574-86.
- Mire-Sluis, A. R. and R. Thorpe (1998). Cytokines. San Diego, Academic Press.
- Moore, P. S., C. Boshoff, et al. (1996). "Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV." Science **274**(5293): 1739-44.
- Moran, P., H. Raab, et al. (1991). "Glycophospholipid membrane anchor attachment. Molecular analysis of the cleavage/attachment site." J Biol Chem **266**(2): 1250-7.
- Morita, K., M. Miura, et al. (2001). "Early chemokine cascades in murine cardiac grafts regulate T cell recruitment and progression of acute allograft rejection." J Immunol **167**(5): 2979-84.
- Mueller, A., N. G. Mahmoud, et al. (2006). "Diverse signalling by different chemokines through the chemokine receptor CCR5." Biochem Pharmacol **72**(6): 739-48.
- Murphy, J. E., C. Robert, et al. (2000). "Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity." J Invest Dermatol **114**(3): 602-8.
- Murphy, P. M. (2001). "Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry." Nat Immunol **2**(2): 116-22.
- Murphy, P. M. (2002). "International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature." Pharmacol Rev **54**(2): 227-9.
- Nadeau, K. C., H. Azuma, et al. (1995). "Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokines RANTES and MCP-1." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8729-33.
- Nagano, H., K. C. Nadeau, et al. (1997). "Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats." Transplantation **63**(8): 1101-8.
- Nagarajan, S., M. Anderson, et al. (1995). "Purification and optimization of functional reconstitution on the surface of leukemic cell lines of GPI-anchored Fc gamma receptor III." J Immunol Methods **184**(2): 241-51.
- Nelson, P. J. and A. M. Krensky (1998). "Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around." Curr Opin Immunol **10**(3): 265-70.
- Nelson, P. J. and A. M. Krensky (2001). "Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection." Immunity **14**(4): 377-86.
- Nibbs, R. J., S. M. Wylie, et al. (1997). "Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6." J Biol Chem **272**(51): 32078-83.
- Nicholas, J., V. R. Ruvolo, et al. (1997). "Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6." Nat Med **3**(3): 287-92.

- Notohamiprodjo, M., R. Djafarzadeh, et al. (2005). "Generation of GPI-linked CCL5 based chemokine receptor antagonists for the suppression of acute vascular damage during allograft transplantation." Protein Eng Des Sel.
- Pattison, J., P. J. Nelson, et al. (1994). "RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney." Lancet **343**(8891): 209-11.
- Premkumar, D. R., Y. Fukuoka, et al. (2001). "Properties of exogenously added GPI-anchored proteins following their incorporation into cells." J Cell Biochem **82**(2): 234-45.
- Proudfoot, A. E., R. Buser, et al. (1999). "Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors." J Biol Chem **274**(45): 32478-85.
- Proudfoot, A. E., S. Fritchley, et al. (2001). "The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity." J Biol Chem **276**(14): 10620-6.
- Proudfoot, A. E., C. A. Power, et al. (1996). "Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist." J Biol Chem **271**(5): 2599-603.
- Rathanaswami, P., M. Hachicha, et al. (1993). "Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines." J Biol Chem **268**(8): 5834-9.
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.
- Rot, A. and U. H. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells." Annu Rev Immunol **22**: 891-928.
- Sallusto, F., C. R. Mackay, et al. (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Schall, T. J., K. Bacon, et al. (1990). "Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES." Nature **347**(6294): 669-71.
- Segerer, S., P. J. Nelson, et al. (2000). "Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies." J Am Soc Nephrol **11**(1): 152-76.
- Selvaraj, P., M. L. Dustin, et al. (1987). "Deficiency of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Functional correlates and evidence for a phosphatidylinositol membrane anchor." J Exp Med **166**(4): 1011-25.
- Shaw, J. P., Z. Johnson, et al. (2004). "The X-ray structure of RANTES: heparin-derived disaccharides allows the rational design of chemokine inhibitors." Structure **12**(11): 2081-93.
- Simmons, G., P. R. Clapham, et al. (1997). "Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist." Science **276**(5310): 276-9.
- Skelton, N. J., F. Aspiras, et al. (1995). "Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type." Biochemistry **34**(16): 5329-42.
- Snowden, N., A. Hajeer, et al. (1994). "RANTES role in rheumatoid arthritis." Lancet **343**(8896): 547-8.
- Song, E., H. Zou, et al. (2002). "Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy." Kidney Int **61**(2): 676-85.

- Souza, D. G., R. Bertini, et al. (2004). "Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury." *Br J Pharmacol* **143**(1): 132-42.
- Sozzani, S., P. Allavena, et al. (2000). "Chemokine receptors: interaction with HIV-1 and viral-encoded chemokines." *Pharm Acta Helv* **74**(2-3): 305-12.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." *Cell* **76**(2): 301-14.
- Taub, D. D., A. R. Lloyd, et al. (1993). "The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets." *Adv Exp Med Biol* **351**: 139-46.
- Taub, D. D., T. J. Sayers, et al. (1995). "Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity." *J Immunol* **155**(8): 3877-88.
- Turner, L., S. G. Ward, et al. (1995). "RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase." *J Immunol* **155**(5): 2437-44.
- Tykocinski, M. L., H. K. Shu, et al. (1988). "Glycolipid reanchoring of T-lymphocyte surface antigen CD8 using the 3' end sequence of decay-accelerating factor's mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(10): 3555-9.
- Valente, J. F. and J. W. Alexander (1998). "Immunobiology of renal transplantation." *Surg Clin North Am* **78**(1): 1-26.
- Van Damme, J., S. Struyf, et al. (1999). "The role of CD26/DPP IV in chemokine processing." *Chem Immunol* **72**: 42-56.
- von Hundelshausen, P., K. S. Weber, et al. (2001). "RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium." *Circulation* **103**(13): 1772-7.
- von Luettichau, I., P. J. Nelson, et al. (1996). "RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues." *Cytokine* **8**(1): 89-98.
- Walter, E. I., W. D. Ratnoff, et al. (1992). "Effect of glycoinositolphospholipid anchor lipid groups on functional properties of decay-accelerating factor protein in cells." *J Biol Chem* **267**(2): 1245-52.
- Weber, C. and R. R. Koenen (2006). "Fine-tuning leukocyte responses: towards a chemokine 'interactome'." *Trends Immunol* **27**(6): 268-73.
- Weber, M. C., R. K. Groger, et al. (1994). "A glycosylphosphatidylinositol-anchored cytokine can function as an artificial cellular adhesin." *Exp Cell Res* **210**(1): 107-12.
- Whyte, A. and R. M. Binns (1994). "RANTES and chemokines in rheumatoid arthritis." *Lancet* **343**(8908): 1291-2.
- Wiedermann, C. J., E. Kowald, et al. (1993). "Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine." *Curr Biol* **3**(11): 735-9.
- Witt, D. P. and A. D. Lander (1994). "Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations." *Curr Biol* **4**(5): 394-400.
- Xia, M., D. Leppert, et al. (1996). "Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane." *J Immunol* **156**(1): 160-7.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et al. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* **33**(1): 103-19.
- Yun, J. J., D. Whiting, et al. (2004). "Combined blockade of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 attenuates chronic rejection." *Circulation* **109**(7): 932-7.
- Zhang, F., B. Crise, et al. (1991). "Lateral diffusion of membrane-spanning and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins: toward establishing rules governing the lateral mobility of membrane proteins." *J Cell Biol* **115**(1): 75-84.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.

IX DANKSAGUNG

PD. Dr. Peter Nelson für die hervorragende Lehre und geduldige Betreuung die den Abschluss dieser Arbeit ermöglichte.

Anke Mojaat für die grossartige Unterstützung und Einarbeitung in viele Techniken und die vielen freundschaftlichen Gespräche.

Die gesamte Arbeitsgruppe (Dr. Farah Djafarzadeh, Dr. Irene Teichert-von Lüttichau, Mike Notohamiprodjo, Ana Vicente Arroyo, Christian Zischek) für die freundschaftliche Atmosphäre und Zusammenarbeit.

Dr. Nicolas Thomä, PhD für viele hilfreiche Tipps bei der Auswahl des Themas und Durchführung dieser Arbeit.

Dr. Wolfgang Huppertz für das Korrekturlesen.

X CURRICULUM VITAE

AUSBILDUNG

- 1983-1996** Schulausbildung in Essen (kath. Grundschule „Am Krausen Bäumchen“; Helmholtz Gymnasium), Abitur (Note: 1,1)
- August 1996-August 1997** Zivildienst (Familien – und Krankenpflege e.V., Essen)
- April 1998- Oktober 2004** Medizinstudium an der LMU München
- April 2001-September 2004** Medizindoktorand im Bereich der Chemokinbiologie, AG Klin. Biochemie, Klinikum Innenstadt München; Stipendiat im Graduiertenkolleg 438 „vaskuläre Biologie in der Medizin“ (Doktorarbeit eingereicht)
- November 2004 - Mai 2005** Assistenzarzt, Pulmonologie, Universitätsklinik Nantes, Frankreich
- Dez. 2005-Oktober 2006** Assistenzarzt, Medizinische Klinik II, Phillipusstift, Essen (davon 5 Monate Intensivstation)
- Nov. 2006 – Mai 2009** Assistenzarzt der Hepatogastroenterologie an den Abteilungen der Pariser Universitätskliniken Beaujon, Lariboisière, Bichat und Cochin nach Rotationsprinzip (davon 3 Monate Intensivstation).
- Ab Juni 2009** Assistenzarzt an der Klinik für Gastroenterologie, Marienhospital, Essen

FAMULATUREN/PJ/KURSE/PUBLIKATIONEN

- Sept. 2000-Sept.2003** Famulaturen (Pädiatrie, Innere Medizin, Allgemeinmedizin, Allgemeinchirurgie) in St.Nazaire (Frankreich), München und Pamplona (Spanien).
- Oktober 2003 – Sept. 2004** Praktisches Jahr: Innere Medizin, Med. Poliklinik München, Clinique Chirurgicale A, Universitätsklinik Nantes (Frankreich), Haunersches Kinderspital, München.
- September 2006** Fortbildung über allgemeine und spezielle Notfallbehandlung („Notfallkurs“)
- Juni 2008** Endoskopiekurs „Université d’Endoscopie“ der franz. Gesellschaft für Endoskopie (SFED)

Februar 2009

Endoscopic resection of unresectable polyps ; Coriat, Huppertz, et al., Current Colorectal Cancer Reports 2009, 5:30–34

März 2009

Poster: „Application des recommandations ANAES de la Coloscopie en France : Enquête de pratique“, JFHOD Paris 2009 (internationaler französischsprachiger Kongress der Hepatogastroenterologie)

SPRACHEN

Französisch/Deutsch
Spanisch/Englisch

Muttersprachen
Fließend

Sonstiges

Dezember 1996

Erster Sieger im Bundeswettbewerb Fremdsprachen und Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes.