

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie
und Pathophysiologie
(im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Die Bedeutung der Tyrosinkinase Syk für die
Aktivierung der
PI3-Kinase bei der β_2 -Integrin-abhängigen
Leukozytenmigration**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Cornelia Then
aus Ulm

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Barbara Walzog
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Siess
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann
Priv. Doz. Dr. Konrad Trülzsch

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Jürgen Schymeinsky

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2008

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit selbstständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

München,

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Die akute Entzündungsreaktion</i>	1
1.1.1. Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten während der Entzündungsreaktion.....	2
1.1.2. Die Adhäsionsmoleküle der β_2 -Integrinfamilie	4
1.2. <i>Die chemotaktisch gesteuerte Migration</i>	6
1.2.1. Richtungswahrnehmung	7
1.2.2. Polarisierung und Kontrolle des Zytoskeletts	11
1.3. <i>Signaltransduktion von Integrinen ins Zellinnere (Outside-in-Signaling)</i>	15
1.4. <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	19
2. Material und Methoden	21
2.1. <i>Material</i>	21
2.1.1. Chemikalien.....	21
2.1.2. Puffer und Lösungen	21
2.1.3. Antikörper.....	22
2.1.4. Zelllinien.....	22
2.1.5. Versuchstiere	23
2.1.6. Software.....	23
2.2. <i>Methoden</i>	23
2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.2.2. <i>Expand High Fidelity</i> Polymerase-Kettenreaktion	24
2.2.3. Zielgerichtete Mutagenese.....	25
2.2.4. DNA-Analyse.....	25
2.2.5. DNA-Gelelektrophorese	26
2.2.6. DNA-Extraktion aus Agarosegel	26
2.2.7. DNA-Ligation.....	27
2.2.8. Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.2.9. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	28
2.2.10. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	29
2.2.11. mRNA-Isolierung.....	30
2.2.12. Reverse Transkription.....	30
2.2.13. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	31
2.2.14. Elektrotansfer von Proteinen auf Nitrozellulose	32
2.2.15. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose.....	32
2.2.16. Zellkultur	33
2.2.17. Isolierung muriner neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark.....	33
2.2.18. Transiente Transfektion hämatopoetischer Zelllinien durch Elektroporation.....	34
2.2.19. Adhäsionsassay.....	34
2.2.20. Migrationsassay	35
2.2.21. Mikroskopische Fluoreszenz- und Video-Zeitraffer-Analysen	35
2.2.22. Statistische Analyse.....	36
3. Ergebnisse	37
3.1. <i>Herstellung der Expressionsvektoren</i>	37
3.2. <i>Transiente Transfektion hämatopoetischer Zelllinien mit den Expressionsvektoren Syk-EGFP, EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F</i>	38
3.3. <i>Expressionsanalyse der Transfektanten</i>	40
3.4. <i>Funktionelle Charakterisierung der Transfektanten</i>	44
3.5. <i>Zeitliche Instabilität der Lamellipodien EGFP-Syk Y323F exprimierender dHL-60-Zellen</i>	46

3.6. Migrationsdefekt EGFP-Syk Y232F exprimierender dHL-60-Zellen	47
3.7. Syk-Tyr ³²³ spielt eine Rolle bei der Umverteilung der PI3K-Untereinheit p110 δ in das Lamellipodium	48
3.8. Bildung multipler Lamellipodien und verminderte Anreicherung der PI3K-Untereinheit p110 δ in dHL-60 Syk-siRNA-Zellen	51
3.9. Verminderte Anreicherung von PI3K-Produkten im Lamellipodium von dHL-60-PHakt-GFP-Zellen nach pharmakologischer Hemmung von Syk.....	52
3.10. Umverteilung von Cbl und Vav in das Lamellipodium von EGFP-Syk- und EGFP-Syk Y323F-Transfektanten	54
3.11. Defekte Polarisierung von Syk-defizienten murinen neutrophilen Granulozyten.....	56
4. Diskussion	58
4.1. Die Herstellung GFP-gekoppelter Syk-Konstrukte für die Analyse der Migration	58
4.2. Die Rolle von Syk bei der β_2 -Integrin-abhängigen Polarisierung und Migration	59
4.3. Outside-in-Signaling.....	61
4.4. Ausblick.....	66
5. Zusammenfassung.....	70
Literaturverzeichnis.....	72
Anhang.....	81
Abkürzungsverzeichnis	81
Danksagung	84
Curriculum vitae	85
Publikationen und Kongressbeiträge	86

1. Einleitung

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind Träger der unspezifischen zellulären Abwehr des menschlichen Organismus. Die unspezifische Abwehr ist von Bedeutung für die Wundheilung, die Elimination geschädigter Zellen, z.B. nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden, und für die Beseitigung von eingedrungenen Mikroorganismen im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion (Nathan, 2006). Nach dem Eindringen in den Körper befinden sich Mikroorganismen und Fremdkörper meist im Gewebe und sind somit für im Blutstrom zirkulierende Granulozyten nicht unmittelbar erreichbar. Daher kommt der Fähigkeit der Abwehrzellen, aus dem Blut in das entzündete Gewebe einzuwandern, eine entscheidende Bedeutung zu. Die PMN üben jedoch nicht nur protektive Funktionen aus, sondern sie spielen z.B. auch bei der Pathogenese von akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen eine große Rolle (Eyles *et al.*, 2006). Ein fundamentales Verständnis der biochemischen Signaltransduktionskaskaden, die zu gerichteter Zellbeweglichkeit führen, ist daher Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Ansätze in Diagnostik, Therapie und Prävention vieler entzündlicher Krankheitsbilder.

1.1. Die akute Entzündungsreaktion

Die akute Entzündungsreaktion wird durch physikalische, chemische oder biologische Reize ausgelöst und ist im Wesentlichen durch fünf Hauptmerkmale gekennzeichnet: *Dolor*, *Tumor*, *Calor*, *Rubor* und *Functio laesia* des betroffenen Körperteils. Die genannten Symptome sind Ausdruck der bei einer Entzündung auftretenden Steigerung von Durchblutung und Gefäßpermeabilität und der Aktivierung und Extravasation von Leukozyten ins Gewebe. Zerstörte Zellen und eingedrungene Fremdkörper werden von Gewebsmakrophagen phagozytiert. Aktivierte Makrophagen setzen lokale Entzündungsmediatoren frei, die eine in drei Phasen ablaufende örtliche Durchblutungsstörung hervorrufen. Phase 1 führt unter Adrenalinausschüttung zur Verengung der Arteriolen mit einer nur Sekunden bis Minuten dauernden Minderdurchblutung. In der 2. Phase löst sich der Arteriolenasmus unter dem Einfluss des vegetativen Nervensystems und es resultiert eine lokale Hyperämie. Die dritte Phase wird durch Histamine, Prostaglandine, Serotonine, Kinine und weitere Mediatoren bedingt und erhöht unter

anderem die Permeabilität der Gefäßwände. Der erhöhte Blutfluss in Phase 2 und die gesteigerte Durchlässigkeit der Gefäßwände in Phase 3 führen zu einem vermehrten Flüssigkeitsaustritt ins Gewebe und erklären die bei der Entzündung auftretende Erwärmung, Rötung und Schwellung. Mit dem gesteigerten Blutstrom werden auch vermehrt neutrophile Granulozyten angeschwemmt, welche die Fähigkeit besitzen, am Entzündungsort aus den Gefäßen auszuwandern. Dort üben sie innerhalb des Gewebes ihre Abwehrfunktion aus, indem sie eingedrungene Partikel und Zellreste phagozytieren, und bilden zusammen mit den ebenfalls einwandernden Monozyten bzw. Makrophagen die unspezifische Abwehr. Zusätzlich kann die spezifische Abwehr aktiviert werden, deren Hauptvertreter Lymphozyten sind. Im Idealfall endet der Entzündungsprozess mit einer *Restitutio ad Integrum*; er kann sich aber bei Insuffizienz der Abwehrmechanismen auch auf den gesamten Körper ausdehnen und eine Sepsis verursachen. Eines der wichtigsten Elemente für eine effiziente Abwehr ist die rasche und gezielte Auswanderung von Leukozyten aus dem Blut in das betroffene Gewebe (Zhang *et al.*, 2000; Han und Ulevitch, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005; Simon und Green, 2005).

1.1.1. Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten während der Entzündungsreaktion

Im menschlichen Organismus sind neutrophile Granulozyten die ersten Zellen, die in verletztes oder entzündetes Gewebe einwandern. In Zusammenarbeit mit Monozyten und Gewebsmakrophagen übernehmen die PMN viele wichtige funktionelle Reaktionen der angeborenen Abwehr (Nathan, 2006). Ihre volle Funktionsfähigkeit ist daher ein entscheidender Bestandteil der Abwehr. Dies wird z.B. bei neutropenischen Patienten nach einer Chemotherapie deutlich, welche an einer hohen Anfälligkeit für bakterielle Infektionen leiden. Es gibt aber auch angeborene Defekte der PMN-Funktion, z.B. chronisch granulomatöse Erkrankungen (Gougerot-Pocidallo *et al.*, 2006). Andererseits ist eine unzureichende Kontrolle von PMN-abhängigen Funktionen vermutlich ein Hauptfaktor bei der Gewebsschädigung durch überschießende entzündliche Antworten wie bei der rheumatoiden Arthritis oder bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Dallegrì und Ottonello, 1997; Wipke *et al.*, 2001; Eyles *et al.*, 2006).

Die Auswanderung von PMN aus dem Blutgefäßsystem ins Gewebe findet vorwiegend in den postkapillären Venolen statt. Dabei hat sich das Mehrschritt-Modell der Leukozytenrekrutierung (Abb. 1) als nützlicher Rahmen für das Verständnis dynamischer Veränderungen des Zellverhaltens während einer Entzündung erwiesen (Springer, 1994; Walzog und Gaethens, 2000; Nourshargh und Marelli-Berg, 2005).

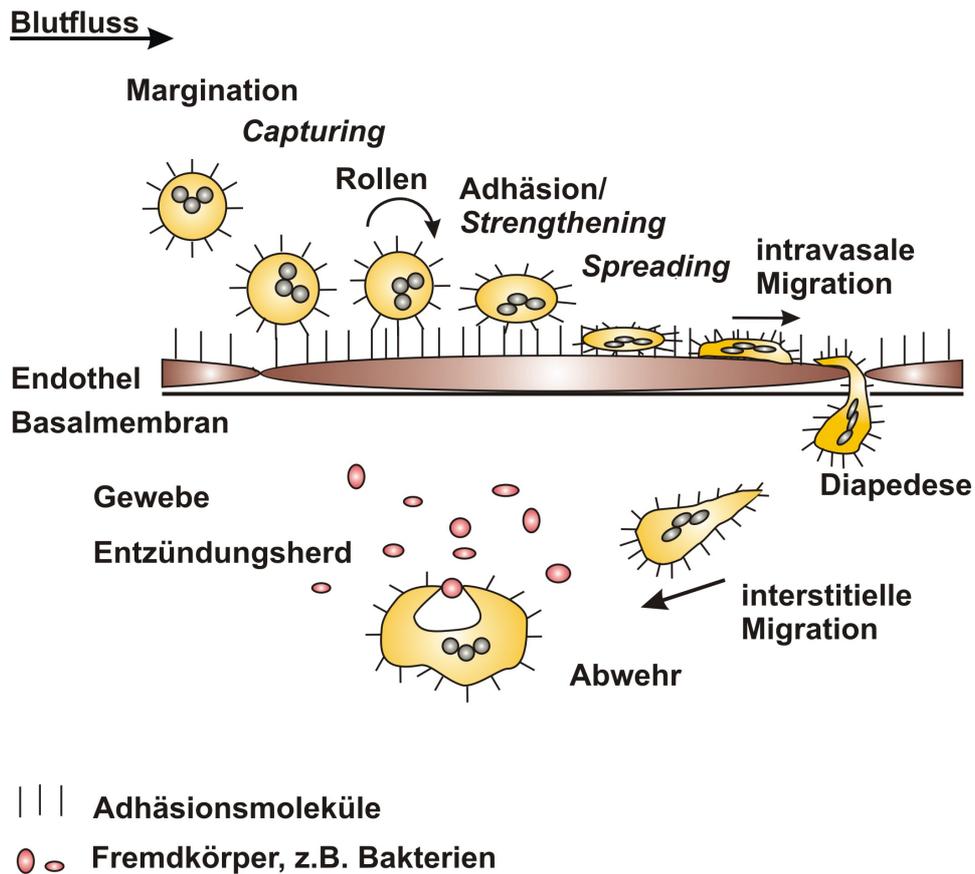


Abb. 1: Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten während der Entzündungsreaktion.

Am Beginn der Extravasation steht die hydrodynamische Margination frei fließender PMN, die so in eine kritische Nähe zur Gefäßwand gelangen. Die Margination macht durch Adhäsionsmoleküle vermittelte Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothel und Leukozyten möglich (*Capturing*). Im Folgenden rollen die Leukozyten über die entzündete Gefäßwand, was ihre Geschwindigkeit stark vermindert. Das initiale *Capturing* und Rollen wird durch Adhäsionsmoleküle der Selektinfamilie vermittelt. Selektine weisen eine hohe Bindungskinetik auf und sind an der Spitze der Mikrovilli positioniert (Von Andrian *et al.*, 1995). Die verminderte Geschwindigkeit der

Leukozyten begünstigt ihre Aktivierung durch von Endothelzellen sezernierte Mediatoren. Auch das Rollen selbst induziert Signalwege in den Leukozyten, wodurch diese zusätzlich aktiviert werden (Ley und Reutershan, 2006). Die Aktivierung ist eine Voraussetzung für ihre feste Adhäsion, welche von Adhäsionsmolekülen der Integrinfamilie vermittelt wird. Neuere Studien schlagen vor, zwei weitere Schritte in der Rekrutierungskaskade zu definieren: Die Integrin-abhängige Verstärkung (*Strengthening*) der Adhäsion (Ley und Zarbock, 2006), welche als Vorbereitung für das *Spreading* dient, und die anschließende ebenfalls Integrin-abhängige intravasale Migration zu den Interzellularspalten (Phillipson *et al.*, 2006; Schreiber *et al.*, 2007). Bei der darauf folgenden Transmigration durchdringen die Leukozyten die Endothelzellschicht und die Basalmembran (Nourshargh und Marelli-Berg, 2005). Die PMN-Endothel-Interaktion führt zur Modifizierung der Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Endothelzellen und erleichtert so die transendotheliale Diapedese über Interzellularspalten (Johnson-Leger und Imhof, 2003). Daneben besteht für die PMN die Möglichkeit, das subendotheliale Gewebe durch Endothelzellen hindurch zu erreichen (Carman und Springer, 2004; Petri und Bixel, 2006; Carman *et al.*, 2007). Anschließend wandern die PMN entlang extrazellulärer Fasern oder Fibrin chemotaktisch gesteuert zum Entzündungsort, wo sie schließlich ihre Abwehrfunktion ausüben.

1.1.2. Die Adhäsionsmoleküle der β_2 -Integrinfamilie

Adhäsionsmoleküle verschiedener Proteinfamilien sind für die Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe von entscheidender Bedeutung. Vor allem bei der intravasalen Adhäsion und Migration der Leukozyten, die den entstehenden Scherkräften entgegenwirken muss, spielt die Integrinfamilie eine zentrale Rolle, insbesondere die β_1 -, β_2 - und β_7 -Integrine (Taylor *et al.*, 1996; Simon und Green, 2005). Im Gegensatz zu Selektinen sind Integrine primär von den Mikrovilli ausgeschlossen und binden ihre Liganden mit relativ langsamen Assoziations- und Dissoziationsraten (Tohya und Kimura, 1998). Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die aus jeweils einer α - und einer β -Kette bestehen. Bisher sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten in Säugetierzellen identifiziert worden, aus denen sich insgesamt mindestens 24 $\alpha\beta$ -Paare zusammensetzen (Luo *et al.*, 2007). PMN exprimieren am stärksten die β_2 -Integrin-Subfamilie, deren gemeinsames Strukturmerkmal die einheitliche β -Kette (CD18) ist. Die Mitglieder der β_2 -Integrin-

Familie sind mit jeweils einer von vier α -Ketten assoziiert und werden folgendermaßen bezeichnet: CD11a/CD18 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1* (LFA-1); α L β ₂), CD11b/CD18 (*Macrophage Antigen-1* (Mac-1); α M β ₂; CR3), CD11c/CD18 (gp150/95; α X β ₂; CR4) und CD11d/CD18 (α D β ₂) (Kinashi, 2005; Luo *et al.*, 2007). Die Mitglieder der β ₂-Integrin-Subfamilie zeichnen sich weiterhin durch ihre Bindungseigenschaften aus. LFA-1 bindet an ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), das als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird (Dustin und Springer, 1988). Weitere Liganden von LFA-1 sind ICAM-2, ein konstitutiv vom Endothel exprimiertes Adhäsionsmolekül (de Fougères *et al.*, 1991), und leukozytäres ICAM-3, durch das homotypische Interaktionen zwischen Leukozyten vermittelt werden (Simon *et al.*, 1992). Mac-1, welches das am stärksten exprimierte β ₂-Integrin auf PMN ist, zeichnet sich durch ein weites Bindungsspektrum aus: Es bindet an ICAM-1, Fibrinogen, Fibrin, den Komplementfaktor C3bi, den Faktor X und Kollagen Typ II und IV (Lub *et al.*, 1996; Arnaout, 1990; Diamond *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1983; Wright *et al.*, 1988; Walzog *et al.*, 1995; Plow *et al.*, 2000). Darüber hinaus erkennt Mac-1 auch körperfremde Moleküle, z.B. bakterielle Lipopolysaccharide und Heparin (Diamond *et al.*, 1995). Das β ₂-Integrin gp150/95 bindet ICAM-1, Fibrinogen und C3bi (Bisland *et al.*, 1994; Loike *et al.*, 1991). CD11d/CD18 wird vor allem auf Lymphozyten, vermutlich aber nicht auf PMN exprimiert (Danilenko *et al.*, 1995). Seine Liganden sind VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) und ICAM-3 (Grayson *et al.*, 1999; Van der Vieren *et al.*, 1995).

Durch Antikörperblockierungen und intravitale Mikroskopie von Leukozyten transgener Mäuse konnte gezeigt werden, dass LFA-1 und Mac-1 die größte Bedeutung im Hinblick auf die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten haben (Furie *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1989). LFA-1 unterstützt dabei über die Interaktion mit ICAM-1 das langsame Rollen und die Arretierung, während Mac-1 durch eine langsamere Bindungskinetik unter Strömungsbedingungen eine stabile Adhäsion aufrecht erhält (Hentzen *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2006). Während LFA-1 eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von PMN an die Gefäßwand spielt, ist Mac-1 von zentraler Bedeutung bei der Migration und der Aktivierung von Effektorfunktionen (Mayadas und Cullere, 2005; Hirahashi *et al.*, 2006; Phillipson *et al.*, 2006).

Die physiologische Bedeutung der β_2 -Integrine wird bei den Auswirkungen der Leukozytenadhäsionsdefizienz-Typ1 (LAD-Typ1) deutlich (Bowen *et al.*, 1982; Anderson und Springer, 1987). Die LAD-Typ1 ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch rekurrente Infektionen und verzögerte Wundheilung gekennzeichnet ist. Ursächlich ist ein Gendefekt der β_2 -Untereinheit CD18, der eine verminderte Expression von LFA-1, Mac-1 und gp150/95 bewirkt. Durch konstitutive Ausschaltung des CD18-Gens in der Maus konnte ein Modellsystem für die LAD-Typ1 etabliert werden (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1998), bei dem die Rekrutierung von PMN an den Entzündungsort wie bei der LAD-Typ1 selbst massiv gehemmt ist (Walzog *et al.*, 1999). Die Ursache der symptomgebildenden insuffizienten Leukozytenfunktion ist neben der gestörten β_2 -Integrin-vermittelten Adhäsion die ebenfalls gestörte β_2 -Integrin-abhängige Migration der Abwehrzellen sowie die verminderte β_2 -Integrin-vermittelte Aktivierung von Zellfunktionen wie der Phagozytose.

1.2. Die chemotaktisch gesteuerte Migration

Die Zellmigration besteht aus zwei grundsätzlichen Komponenten: Zunächst bewegt die Zelle ihr Vorderende in Richtung des chemotaktischen Stimulus. Damit der Zellkörper der Bewegung folgen kann, muss er kontrahieren und das hintere Ende (Uropod) von der Matrix ablösen. Die anfängliche Antwort einer Zelle auf einen Migrationsstimulus besteht in der Polarisierung in einen anterioren und einen posterioren Pol (Van Haastert und Devreotes, 2004). Am anterioren Pol streckt die Zelle Fortsätze aus, die entweder groß und breit (Lamellipodien), oder *Spike*-ähnlich (Filopodien) sein können; es folgt die Formierung neuer Adhäsionen über Transmembranrezeptoren, die mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind und während der Migration als Zugpunkte dienen, über die sich die Zelle hinwegbewegt (Kirfel *et al.*, 2004). Bei der Lösung des hinteren Zellpols ist vermutlich die kalziumabhängige Protease Calpain beteiligt. Die in migrierenden Zellen am Uropod aufgebaute Zugspannung könnte ausreichen, um sogenannte *stretch-activated* Kalziumkanäle zu öffnen (Lee *et al.*, 1999). Durch einströmendes Kalzium aktiviertes Calpain hat das Potenzial, verschiedene zytoskelettassoziierte Proteine zu spalten, darunter Integrine, Talin, Vinkulin, die *Focal Adhesion Kinase* und Syk (*Spleen Tyrosine Kinase*) (Hendey *et al.*, 1992; Glading *et al.*, 2002; Baldock *et al.*, 2000).

Wesentliche Voraussetzungen für die Migration von Leukozyten sind die Richtungswahrnehmung und die Polarisierung der Zelle.

1.2.1. Richtungswahrnehmung

Die Fähigkeit zur Richtungswahrnehmung beruht auf der Erkennung eines asymmetrischen extrazellulären Gradienten eines so genannten Chemotaxins und der Generierung von verstärkten intrazellulären Antworten durch die Zelle (Van Haastert und Devreotes, 2004). Chemotaxine sind zystinreiche Moleküle, die eine gerichtete Chemotaxis induzieren und darüber hinaus eine Rolle bei der Entwicklung von Organen, der Angiogenese und der Bildung und Metastasierung von Tumoren spielen. Chemotaxine besitzen untereinander ähnliche Aminosäuresequenzen und binden an 7-transmembran-Rezeptoren, die ihre Signale über angekoppelte G-Proteine weitergeben. Die meisten Mitglieder der körpereigenen Chemokinfamilie lassen sich zwei Gruppen zuordnen: Den CC-Chemokinen mit zwei benachbarten Cysteinen und den CXC-Chemokinen, bei denen die Cystinreste durch eine Aminosäure getrennt sind. Beispiele für die CXC-Familie sind das Interleukin 8 und der *Stromal Cell-derived Factor-1*. Rantes und das *Monocyte Chemoattractant Protein-1* dagegen sind Mitglieder der CC-Familie. Darüber hinaus bilden Bakterien Peptide, die als Chemotaxine wirken, z.B. das f-Met-Leu-Phe-Peptid (fMLP) (Rot *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2004).

Auch wenn Zellen nur sehr geringen Chemotaxin-Konzentrationsunterschieden (1-2% über den Zellkörper) ausgesetzt werden (Wang *et al.*, 2002), häufen sich Signalmoleküle an der dem Gradienten zugewandten Seite an und setzen dort lokal Signalkaskaden in Gang (Devreotes und Janetopoulos, 2003). Dabei scheinen sich die Chemotaxinrezeptoren jedoch gleichmäßig zu verteilen, so dass die Empfindlichkeit gegenüber dem Chemotaxin auf der gesamten Zelloberfläche gleich bleibt (Servant *et al.*, 1999). Dies ermöglicht der Zelle, auf eine Änderung des Gradienten schnell zu reagieren. In diesem Fall verteilen sich die angehäuften Signalmoleküle dem neuen Gradienten entsprechend um (Devreotes und Janetopoulos, 2003). Die Bindung eines Chemokins an einen G-Protein-gekoppelten 7-transmembran-Rezeptor führt zur Assoziation von GTP mit dem G-Protein-Komplex und als Folge zur Dissoziation von G_α und $G_{\beta\gamma}$ (Wettschureck und

Offermanns, 2005). Der $G_{\beta\gamma}$ -Komplex aktiviert die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), die Isoformen 2 und 3 der Phospholipase C (PLC) (Wu *et al.*, 2007; Hirsch *et al.*, 2000; Wettschureck und Offermanns, 2005) und GEFs (*Guanine Nucleotide-exchange Factors*; Niu *et al.*, 2003). Hierdurch induzierte Signalwege, die GEFs und kleine GTPasen einschließen, führen zur O_2^- -Produktion und zur Regulierung des Zytoskeletts und der Migration (Wettschureck und Offermanns, 2005; Abb. 2).

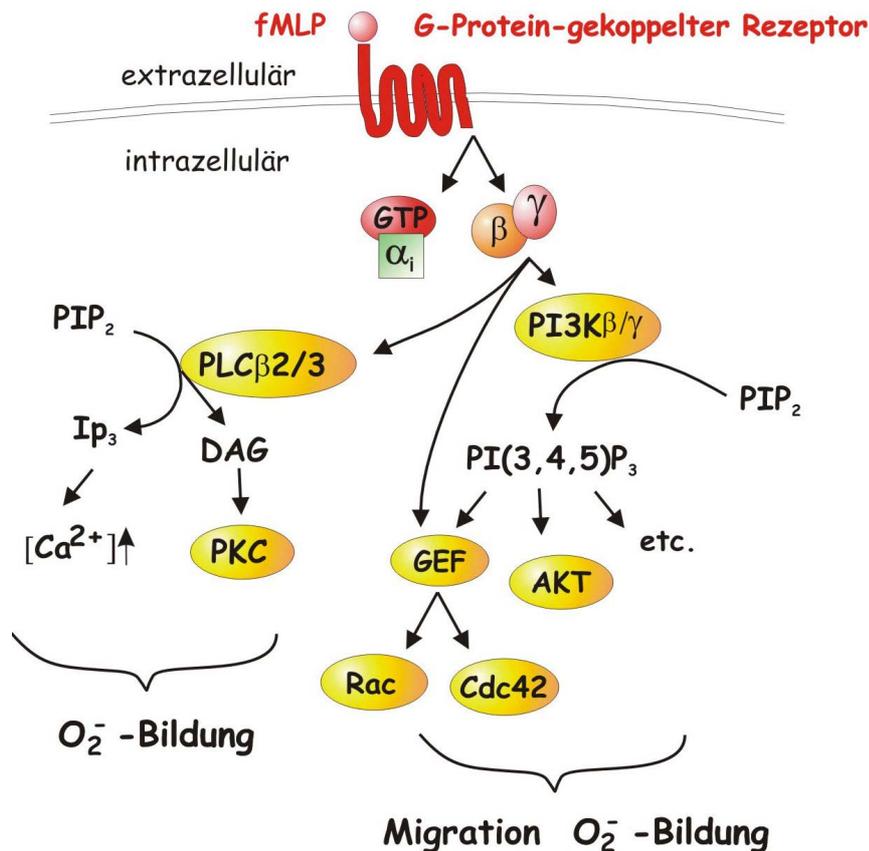


Abb. 2: Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in PMN (modifiziert nach Wettschureck und Offermanns, 2005). DAG: Diacylglycerin, IP $_3$: Inositol 1,4,5-Trisphosphat, PKC: Proteinkinase C, AKT: Proteinkinase B.

Es wird angenommen, dass die richtungsgebundene Wahrnehmung von Chemokinen im Signalweg nach der Aktivierung der G-Proteine und vor der Anhäufung von PIP $_3$ (Phosphatidylinositol(3,4,5)-Triphosphat) durch die PI3K geschieht, denn G-Protein-Untereinheiten werden bei der Polarisierung nur schwach an das vordere Ende umverteilt (Jin *et al.*, 2000; Servant *et al.*, 1999), während die Anhäufung von PIP $_3$ am führenden Zellende ein früher Zeitpunkt ist, an dem eine starke asymmetrische Aktivierung des Signalweges beobachtet werden kann (Wang

et al., 2002). Auch die PI3K selbst wird in einem Chemokingradienten aus dem Zytosol an das Vorderende der Zellen rekrutiert, was die Bedeutung dieser Kinase für die Richtungswahrnehmung unterstreicht (Funamoto *et al.*, 2002; Iijima *et al.*, 2002).

Die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)

Die Mitglieder der PI3K-Familie werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit und ihrer Substratspezifität in die Untergruppen I-III eingeteilt, wobei die Klasse I noch weiter in IA und IB unterteilt wird. Klasse IA-Enzyme sind aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit zusammengesetzte Heterodimere. Von der katalytischen Untereinheit besitzen die Klasse IA-Enzyme drei verschiedene Typen: p110 α und p110 β , welche in den meisten Geweben und Organen exprimiert werden sowie die vor allem in Leukozyten vorhandene katalytische Untereinheit p110 δ (Deane und Fruman, 2004). Daneben haben IA-Enzyme fünf verschiedene regulatorische Untereinheiten: p85 α , p55 α und p50 α stammen durch den Mechanismus des alternativen *Splicing* von einem Gen, während p85 β und p55 γ von verschiedenen Genen kodiert werden. Unter den regulatorischen Untereinheiten wird p85 α am stärksten exprimiert (Koyasu, 2003). Das einzige Mitglied der Klasse IB, p110 γ , wird bevorzugt von Leukozyten exprimiert und ähnelt in seiner Struktur den p110-Mitgliedern der Klasse IA. Allerdings fehlt ihm die Bindungsstelle für p85. Stattdessen interagiert p110 γ mit den regulatorischen Untereinheiten p101 oder p84 (Wymann *et al.*, 1998; Fruman *et al.*, 1998; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001; Katso *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 2006).

Die PI3Ks der Klasse IA werden im Allgemeinen durch Wachstumsrezeptoren und deren verwandte Rezeptortyrosinkinasen aktiviert. In ruhenden Zellen hemmt p85 die Kinaseaktivität von p110. Durch die Bindung der SH2-Domäne (*Src homology 2*-Domäne) von p85 an phosphorylierte Tyrosine von Rezeptortyrosinkinasen oder Adaptermolekülen mit sogenannten YXXM-Motiven (Tyr-X-X-Met) wird die Hemmung der Kinaseaktivität von p110 aufgehoben und das p85-p110-Heterodimer wird zu seinem Substrat an die Plasmamembran rekrutiert (Engelman *et al.*, 2006). Das Klasse IB-Enzym wird nach Ligandenbindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins aktiviert (Leopoldt *et al.*, 1998; Suires *et al.*, 2006). Die verschiedenen Klassen der PI3K übernehmen unterschiedliche

Aufgaben bei der Phosphorylierung von 3-Hydroxylgruppen von Phosphoinositiden (Abb. 3). Die Phosphorylierung von 3-Hydroxylgruppen von Phosphatidylinositol und Phosphoinositiden durch die aktive PI3K ist ein evolutionär hoch konserviertes Regulationssystem von Zellwachstum und Metabolismus und eines der am häufigsten mutierten Systeme in humanen bösartigen Tumoren (Engelman *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2006).

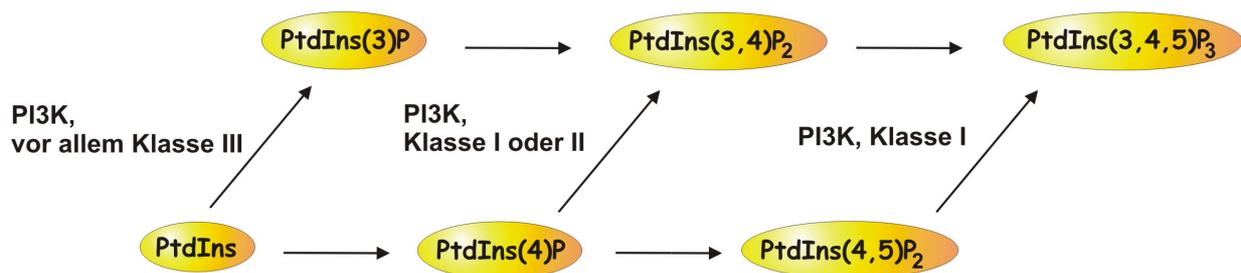


Abb. 3: Diagramm der Synthesewege der 3-Phosphoinositide (modifiziert nach Deane und Fruman, 2004). PtdIns: Phosphoinositide.

Die PI3K wird an den Vorderpol der migrierenden Zelle rekrutiert und dort aktiviert, was eine lokalisierte Produktion von PIP₃ und Phosphatidyl (3,4)-Bisphosphat (PIP₂) an der Zellfront nach sich zieht (Servant *et al.*, 2000). Die Produkte der PI3K, 3-Phosphoinositide, agieren als *Second Messengers*. Proteine mit einer Domäne, die PIP₂ oder PIP₃ erkennt, z.B. die Plekstrin-homologe Region (PH-Domäne), binden spezifisch Phosphoinositide. Hierdurch wird eine lokalisierte Anreicherung der PH-Domänen-tragenden Proteine möglich. Verschiedene für die Chemotaxis bedeutende Proteine besitzen eine solche PH-Domäne, darunter die Serin/Threonin-Protein-Kinase Akt/PKB (Proteinkinase B) und auch GEFs (*Guanine Nucleotide-exchange Factors*) und GAPs (*GTPase-activating Proteins*), welche die kleinen GTPasen der Rho-Familie regulieren (Procko und McColl, 2005). Es wird angenommen, dass Rho-GTPasen durch die Aktivierung von GEFs, z.B. Vav, ein Ziel des PI3K-Signalwegs sind, der auf diese Weise auch auf das Aktin-Zytoskelett einwirkt (Welch *et al.*, 2003; Van Keymeulen *et al.*, 2006). Die Umformung des Zytoskeletts als Endpunkt des Signalwegs ist wichtig, um einen anhaltenden asymmetrischen Gradienten der PI3K-Aktivität aufrecht zu erhalten. Wirkstoffe, die die Aktinpolymerisierung hemmen, vermindern die PIP₃-Synthese und die Polarisation geht verloren (Wang *et al.*, 2002).

Dies beruht möglicherweise auf einer positiven Rückkopplung zwischen den kleinen Rho-GTPasen, F-Aktin und der PI3K: Die Rho-GTPase Rac selbst kann die Rekrutierung der PI3K an die Membran und ihre Aktivierung stimulieren (Srinivasan *et al.*, 2003; Welch *et al.*, 2003).

Die Rolle der PI3K bei der Chemotaxis wurde in verschiedenen Studien untersucht: P110 γ -defiziente PMN waren nicht fähig, nach der Stimulation mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP oder dem Komplementfaktor C5a PIP₃ zu synthetisieren oder die Proteinkinase B zu aktivieren (Sasaki *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). Inflammatorische *in vivo* Modelle haben gezeigt, dass der PI3K γ -defiziente Phänotyp eine Verminderung der Aktivierung und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten um bis zu 90% aufweist (Sasaki *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Hirsch *et al.*, 2000; Yum *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass die PI3K Klasse IA ebenfalls eine Bedeutung für die Adhäsion und Migration hat. So hemmt die Behandlung von PMN mit einem spezifischen Inhibitor für p110 δ die Chemotaxis (Sadhu *et al.*, 2003), die Extravasation von Leukozyten ist in PI3K δ -defizienten Mäusen gestört (Puri *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007) und die β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion und Rekrutierung von PMN sind nach der Blockade von p85 α vermindert (Gao *et al.*, 2007). Weitere Studien zeigen, dass die PI3K in PMN eher bei der Motilität selbst als bei der Orientierung der Zelle von Bedeutung ist (Ferguson *et al.*, 2007; Nishio *et al.*, 2007). Die herausragende Bedeutung der PI3K für die chemotaktische Migration ergibt sich möglicherweise aus der Tatsache, dass die PI3K durch Verknüpfung ihrer Signalwege mit aktinregulierenden Proteinen neben der Wahrnehmung des extrazellulären Gradienten auch in die Regulierung des Zytoskeletts eingreift und so einen Verknüpfungspunkt zwischen Richtungswahrnehmung und Polarisierung herstellt (Iijima *et al.*, 2002).

1.2.2. Polarisierung und Kontrolle des Zytoskeletts

Die Zellpolarisierung ist von der Richtungswahrnehmung abzugrenzen und bedeutet, dass die Zelle einen asymmetrischen Phänotyp einnimmt, an dem man einen anterioren und einen posterioren Pol definieren kann. Die Polarisierung hängt weit stärker als die Richtungswahrnehmung vom Zytoskelett ab (Servant *et al.*, 2000; Fenteany und Glogauer, 2004). Das Lamellipodium ist das auffälligste Merkmal einer polarisierten Zelle und charakterisiert das Vorderende. Es besteht hauptsächlich aus

einem laminaren Netzwerk von Aktinfilamenten und ist bis zu 5 μm breit und ungefähr 0,2 μm dick (Abercrombie *et al.*, 1971). Aktinfilamente sind doppelt helikale Polymere und besitzen eine Polarität mit einem (+)- Ende und einem (-)- Ende. Die schnell wachsenden (+)- Enden sind dabei zur Zellvorderseite hin ausgerichtet. Als protrusive Elemente sind sie an der Zellmotilität beteiligt (Rinnerthaler *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1997). Protrusive Kräfte können sich durch Addition von Untereinheiten am (+)- Ende und einem Verlust von Untereinheiten am (-)- Ende entwickeln. Da eine Zelle ein geschlossenes Kompartiment darstellt, kann eine rasche Aktinpolymerisierung nicht längere Zeit ohne bilanzausgleichende Depolymerisierung andauern (Pollard und Borisy, 2003; Ridley, 2003). In polarisierten Zellen ist das Vorderende sensibler gegenüber dem Chemotaxin, so dass die Zelle bei Veränderung der Richtung des Gradienten mit einer Kehrtwendung reagiert, anstatt ein neues Lamellipodium auszubilden. Diese lokalisierte Sensitivität einer polarisierten Zelle fokussiert die Aktivität des Aktin-Zytoskeletts an das Lamellipodium und ermöglicht so eine schnellere Bewegung der Zelle in Richtung der Chemokinquelle (Devreotes und Janetopoulos, 2003).

Es gibt verschiedene Modellvorstellungen, wie es zu einer Polarisierung von eukaryonten Zellen kommen kann. Ein Vorschlag besagt, dass Zellen randomisiert „Pilot-Pseudopodien“ ausstrecken (Caterina und Devreotes, 1991), welche dann positive Veränderungen des extrazellulären Gradienten wahrnehmen können. Pseudopodien in Richtung des Gradienten würden verstärkt werden, während andere zurückgezogen werden. Ein anderes Modell ist die *first-Hit*-Theorie. Demnach muss der Chemokingradient die Zelle an einer Seite zuerst treffen (Rappel *et al.*, 2002). Diese erste Berührung würde diesem Modell zufolge eine schnelle hemmende Antwort triggern, welche sich über die Zelle ausbreitet und den Uropod daran hindert zu antworten. Eine dritte Vorstellung basiert auf starken zellinternen positiven Rückkopplungsschleifen. Signalmoleküle werden selektiv am Vorderende der Zelle angereichert und aktiviert, so dass es zu einer lokalisierten Antwort kommt (Narang *et al.*, 2001). Hohe Bindungsaktivität am vorderen Zellende könnte die Verfügbarkeit von Signalmolekülen am hinteren Zellpol begrenzen (Modell der „intermediären Depletion“, Postma *et al.*, 2001). Schließlich gibt es noch das Modell der schnellen lokalen Erregung und langsamen globalen Hemmung (Levchenko und Iglesias, 2002; Iglesias und Levchenko, 2002). Keines dieser Modelle hält allen experimentellen

Bedingungen stand. Das Modell der Pilot-Pseudopodien erklärt nicht, wie vollständig immobilisierte Zellen, die keine Pseudopodien mehr ausbilden können, immer noch die Fähigkeit zur Richtungswahrnehmung aufbringen. Die *first-Hit*-Theorie kann nicht erklären, dass eine Zelle auch einen Gradienten wahrnehmen kann, der durch Vermindern der Chemotaxinkonzentration von einem anfangs hohen Level aufgebaut wird. Das Modell der positiven Rückkopplung würde, sobald einmal angestoßen, relativ unabhängig von extrazellulären Signalen werden, was der Fähigkeit einer unpolarierten Zelle, auf schnelle Änderungen der extrazellulären Stimuli zu reagieren, widerspricht. Weiterhin kann dieses Modell nicht erklären, warum die Zelle nur einen Vorderpol und einen Hinterpol hat. Die Vorstellung einer lokalen Erregung und globalen Inhibition ist mit vielen Eigenschaften der Chemotaxis in Einklang zu bringen, hier fehlt allerdings die große Verstärkung durch positive Rückkopplung, die für eine ausreichende intrazelluläre Antwort benötigt wird. Favorisiert wird zunehmend ein Modell, bei dem die Signale am Zellvorderende lokal die Entstehung eines Hinterpols hemmen und umgekehrt, so dass beide Pole sich in voneinander entfernt liegenden Zellpolen stabilisieren (Wong *et al.*, 2006). Andererseits bestehen Evidenzen dafür, dass das Vorderende der Zelle über den Zelldurchmesser hinweg das Hinterende stimuliert (Van Keymeulen *et al.*, 2006). Ein realitätsnahes Schema für die Richtungswahrnehmung *und* die Polarisierung muss vermutlich Elemente verschiedener Modellvorstellungen zusammenbringen.

Die Rolle der Rho-GTPasen bei der Kontrolle des Zytoskeletts

GTPasen (Guanosin-Triphosphat-bindende Proteine) wechseln zwischen der GDP- (inaktiv) und der GTP-gebundenen Konformation (aktiv). Die Aktivierung von Rho-GTPasen erfolgt durch GEFs, die GDP gegen GTP austauschen. In der GTP-gebundenen, aktiven Form interagieren sie mit Zielproteinen und rufen auf diese Weise bis zu ihrer Inaktivierung durch GAPs (GTPase-aktivierende Proteine, welche die Hydrolysierung von GTP zu GDP fördern), zelluläre Antworten hervor (Jaffe und Hall, 2005; Bokoch, 2005).

Die Ras-Superfamilie gehört zu den GTPasen und wird in fünf Hauptgruppen eingeteilt: Ras, Rho, Rab, Arf und Ran, von denen die Rho-GTPasen die wichtigste Rolle bei der chemotaktischen Migration spielen. Inzwischen wurden über 20 humane Rho-GTPasen identifiziert, worunter RhoA/B, Rac1/2 und Cdc42 am

genauesten hinsichtlich ihrer Effekte auf die Migration untersucht wurden. Rho-GTPasen kontrollieren grundlegende Aspekte der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten wie die Orientierung zum chemotaktischen Stimulus und die Definition von anteriorem und posteriorem Pol einer polarisierten Zelle (Charest und Firtel, 2007). Am Lamellipodium spielen die beiden Rho-GTPasen Rac und Cdc42 eine führende Rolle. Beide sind an der Formierung spezifischer Aktin-enthaltender Strukturen beteiligt (Van Aelst *et al.*, 1997; Etienne-Manneville und Hall, 2002). Es gibt verschiedene Wege, auf denen Rac die Aktinpolymerisierung und damit die Lamellipodienbildung fördern kann. Zum einen kann es den Arp2/3 (*Actin-related Proteins 2/3*)-Komplex via die WAVE/WASP (*WASP-Family Verprolin homologous Protein/Wiskott–Aldrich Syndrome Protein*)-Familie der Arp2/3-Aktivatoren aktivieren. Arp2/3 bindet an vorhandene Aktinfilamente und induziert die Bildung von neuen Tochterfilamenten, die vom Mutterfilament abzweigen (Welch, 2000; Pollard und Borisy, 2003). Weiterhin wurde berichtet, dass Rac die Aktivität der LIMK (*LIMK-Domain-containing Kinase*) via PAK (*p21-activated Kinase*) stimuliert (Edwards *et al.*, 1999). Die LIMK wiederum phosphoryliert und inaktiviert Cofilin, ein Protein, welches die Aktindepolymerisierung fördert und eine Bedeutung für die Chemotaxis besitzt (Stanyon und Bernard, 1999; Mounie *et al.*, 2006). Funktionelle Auswirkungen zeigen sich sowohl bei Hemmung als auch bei Überexpression von Rac: Die Migration von Leukozyten ist unter beiden Bedingungen gestört, weil sich Lamellipodien unkontrolliert über den ganzen Zellkörper ausbilden und so eine eindeutige Polarisierung unmöglich machen (Knight *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 1998; Srinivasan *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004).

Cdc42 reguliert ebenfalls am vorderen Zellende die Polarität (Itoh *et al.*, 2002). Es wirkt als Teil des so genannten Zellkompasses, indem es die Ausbildung von Filopodien kontrolliert (Nobes und Hall, 1999). Rezeptoren werden von Zellen mit Hilfe dieser Filopodien in die Umgebung vorgestreckt, wo sie Veränderungen der extrazellulären Signale wahrnehmen und an die Zelle zurückmelden können. Die Aufgabe von Cdc42 in diesem Prozess ist wahrscheinlich die Einleitung der Aktinpolymerisierung durch die Aktivierung von WAS-Proteinen, welche wiederum den Arp2/3-Komplex aktivieren (Welch, 1999; Tomasevic *et al.*, 2007). Ein *Downstream Target* von Cdc42, PAK1, ist ein bekannter Regulator des Zytoskeletts (Bokoch, 2003) und bildet mit Cdc42 einen positiven Regelkreis zur Verstärkung des

Signals am vorderen Zellende (Li *et al.*, 2003). Die Hemmung von Cdc42 lässt aus der Chemotaxis von Makrophagen eine randomisierte Migration werden (Allen *et al.*, 1998). Während Rac vor allem eine Bedeutung bei der Bildung von Lamellipodien zukommt, ist Cdc 42 unerlässlich für die Stabilisierung der Zellpolarität (Srinivasan *et al.*, 2003).

Am Uropod dagegen spielt Rho eine herausragende Rolle. Das Nachziehen des Zellkörpers hängt von der Kontraktilität von Aktin und Myosin ab und wird durch Rho, welches via die *Rho-dependent Kinase* (Rock) an Myosin signalisiert, reguliert (Ridley, 2001). Monozyten, denen Rho fehlt, bilden weiterhin Zellfortsätze aus und migrieren chemotaktisch. Allerdings ist das Nachziehen des Uropods stark vermindert, so dass sie zwar die Invasion ins Gewebe beginnen, dann aber zwischen benachbarten Endothelzellen stecken bleiben (Worthylake *et al.*, 2001). Rho scheint daneben auch für die Hemmung der Lamellipodienbildung wichtig zu sein (Worthylake und Burridge, 2003). Zellen, in denen Rock oder die Funktion des Myosins direkt inhibiert wurde, bildeten neue Lamellipodien an der gesamten Zellperipherie und zeigten gleichzeitig eine erhöhte Aktivität von Rac (Xu *et al.*, 2003). Das weist darauf hin, dass Rho und Rac in sich gegenseitig hemmende Mechanismen eingebunden sind, die es der Zelle möglich machen, durch räumliche Trennung der beiden Signalwege auch auf niedrige externe Konzentrationsunterschiede des Chemotaxins mit einer starken Polarisierung zu reagieren. Dafür spricht auch, dass durch Latrunkulin (ein Inhibitor der Aktinpolymerisierung) und auch durch LY294002 (ein Inhibitor der PI3K), welche beide die Funktion des anterioren Zellpols hemmen, die Aktivität von RhoA ansteigt (Xu *et al.*, 2003). Neue Daten zeigen, dass Rac1 daneben auch eine Rolle bei der Aktivierung von Rho hat (Pestonjamasp *et al.*, 2006), was dafür spricht, dass neben negativen auch positive Rückkopplungsschleifen zwischen dem anterioren und posterioren Zellpol existieren.

1.3. Signaltransduktion von Integrinen ins Zellinnere (*Outside-in-Signaling*)

Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass β_2 -Integrine neben der Vermittlung der Zelladhäsion auch intrazelluläre Funktionen wie die O_2^- -Produktion beeinflussen (Nathan *et al.*, 1989). Diese Signaltransduktion vom Extrazellulärraum in das Zellinnere wird als *Outside-in-Signaling* bezeichnet. Als *Inside-out-Signaling* dagegen

bezeichnet man die Signaltransduktion vom Zellinneren über Integrine in den Extrazellulärraum, was Änderungen in der Affinität und Avidität der Integrine beinhaltet (Kinashi, 2005; Carman und Springer, 2003; Luo *et al.*, 2007).

Initiale Ereignisse nach der Ligandenbindung an β_2 -Integrine sind die Aktivierung der Src-Kinasen Hck, Fgr und Lyn. Hck und Fgr spielen eine zentrale Rolle beim Integrin-vermittelten *Spreading* und der festen Adhäsion (Lowell *et al.*, 1996; Mocsai *et al.*, 1999), während Lyn eine negative Funktion bei der Signalübertragung zukommt (Pereira und Lowell, 2003).

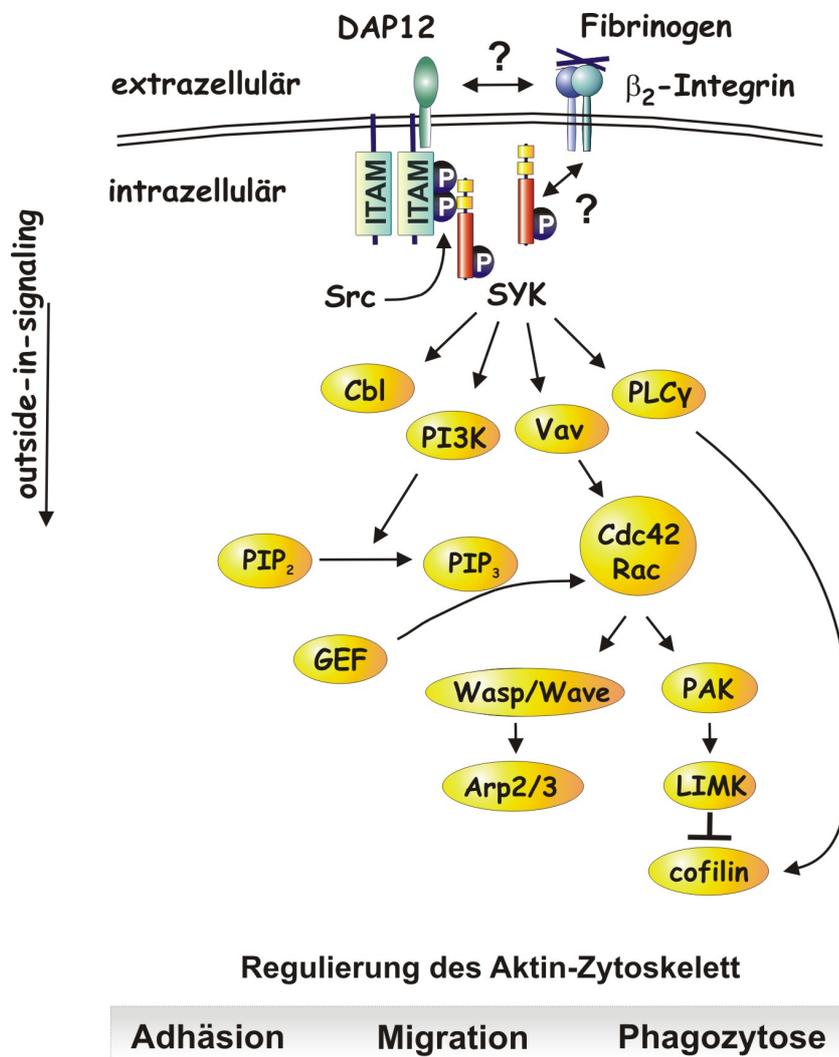


Abb. 4: β_2 -Integrin-vermittelte Syk-Signaltransduktionswege (modifiziert nach Schymeinsky *et al.*, 2007). In PMN ist für eine β_2 -Integrin-vermittelte Signaltransduktion die Tyrosinphosphorylierung einer ITAM-tragenden Seitenkette des DAP12-Adaptermolekül durch eine Src-Kinase notwendig. Syk kann daraufhin mit seinen SH2-Domänen an das phosphorylierte ITAM binden und weitere Signalwege aktivieren.

Die Src-Kinasen phosphorylieren vermutlich die ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)-tragenden transmembranen Adaptermoleküle DAP12 (*DNAX activating Protein 12*) und FcR γ (*Fc Receptor γ -chain*), was zur Aktivierung von Syk führt (Mocsai *et al.*, 2006). Auf welchem Weg DAP12 mit den β_2 -Integrinen interagiert und dadurch Syk aktiviert, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Syk führt den Signalweg fort zu einer Reihe von *Downstream Targets*, die eine Rolle bei β_2 -Integrin-vermittelten zellulären Funktionen neutrophiler Granulozyten, z.B. dem *Spreading* (Mocsai *et al.*, 2002; Willeke *et al.*, 2003), der Phagozytose (Shi *et al.*, 2006) und der Chemotaxis (Schymeinsky *et al.*, 2005) einnehmen (Abb. 4).

Die Tyrosinkinase Syk

Proteintyrosinkinassen (PTKs) sind Enzyme, die Phosphatgruppen von ATP auf bestimmte Hydroxylgruppen von Tyrosinresten auf Zielproteinen übertragen. Viele PTKs katalysieren auch intra- oder intermolekulare Autophosphorylierungsreaktionen, die zu ihrer eigenen kovalenten Modifikation führen. Eine dieser PTKs ist die Tyrosinkinase p72^{Syk} (Syk; *Spleen Tyrosine Kinase*), die erstmalig in der Schweinemilz beschrieben wurde (Zioncheck *et al.*, 1988) und diesem Umstand ihren Namen verdankt.

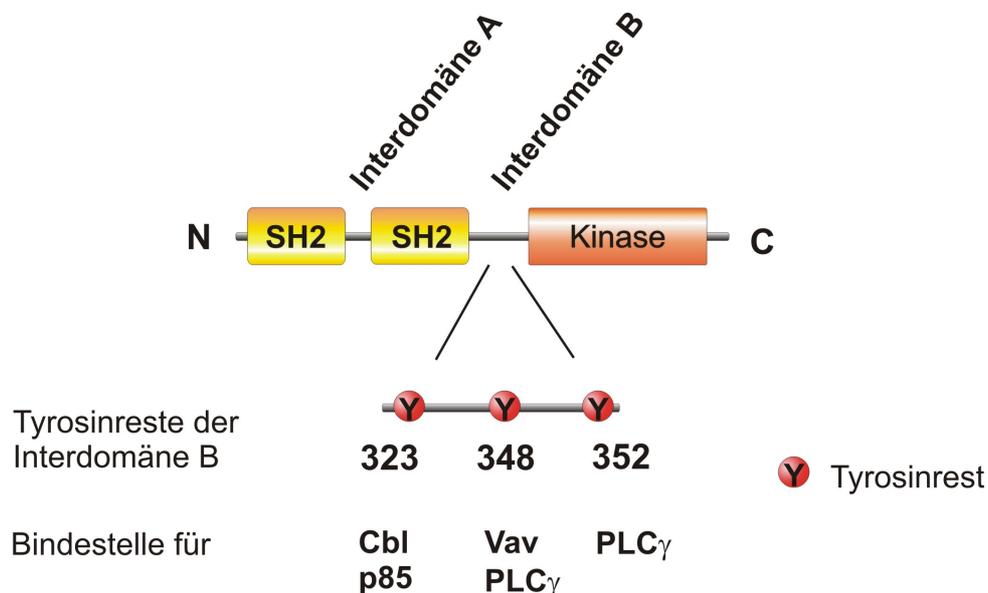


Abb. 5: Schematische Struktur der Tyrosinkinase Syk. Die N-terminalen SH2-Domänen sind durch die Interdomäne B von der Kinasedomäne getrennt. Tyrosinreste der Interdomäne B dienen als Bindestelle für verschiedene Interaktionspartner von Syk.

Im Gegensatz zu den meisten PTKs handelt es sich bei Syk um eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase. Syk besitzt ein Molekulargewicht von 72 kDa und setzt sich aus zwei tandemartig angeordneten aminoterminalen SH2 (*Src homology 2*) -Domänen zusammen (Abb. 5), zwischen denen die Interdomäne A liegt. Die C-terminale Kinase-Domäne wird durch die Interdomäne B von den SH2-Domänen getrennt (Sada *et al.*, 2001). Syk wird hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist dort von entscheidender Bedeutung bei Signalübertragungsprozessen. Die beiden SH2-Domänen von Syk heften sich bevorzugt an Sequenzen mit zwei Phosphotyrosinresten in ganz bestimmtem Abstand voneinander. Diese Situation ist bei ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) gegeben. ITAMs sind eine konservierte Sequenz von vier Aminosäuren, die im zytoplasmatischen Teil von Immunrezeptoren (z.B. B-Zell-, T-Zell- und Fc-Rezeptor) zweimalig wiederholt wird. Daneben spielen ITAMs auch bei der Signalübertragung von Integrinen und Chemokinrezeptoren eine Rolle (Mocsai *et al.*, 2006; Abram und Lowell, 2007). Nach der Aktivierung des ITAM-assoziierten Rezeptors durch Antigenbindung und darauf folgender Phosphorylierung bilden ITAMs eine hochaffine Bindungsstelle für Syk (Underhill und Goodridge, 2007). Die Assoziation der Syk-Tandem-SH2-Domäne mit tyrosinphosphorylierten ITAMs stimuliert sowohl die Syk-Autophosphorylierung als auch die Src-abhängige Phosphorylierung (El-Hillal *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

Aktives Syk erfüllt in hämatopoetischen Zellen eine Vielzahl von Funktionen, unter anderem im β_2 -Integrin-Signalweg. Syk-defiziente PMN weisen als Ausdruck des gestörten Integrinsignalweges einen Defekt im *Spreading* als Antwort auf proinflammatorische Stimuli auf (Mocsai *et al.*, 2002). Es gibt Hinweise, dass Syk eine Rolle bei der Stabilisierung der Zellpolarität von Leukozyten hat. So wird Syk in PMN nach deren Stimulation mit fMLP nach anterior in das Lamellipodium umverteilt und für die Kontrolle der Lamellipodienbildung und die Chemotaxis benötigt (Schymeinsky *et al.*, 2005). Ähnliches wurde auch für Makrophagen gezeigt, deren Chemotaxis und Aktinpolymerisierung nach Hemmung von Syk gestört war (Gevrey *et al.*, 2005). Zudem benötigen differenzierte HL-60-Zellen (ein Modellsystem für neutrophile Granulozyten; Gallagher *et al.*, 1979; Hauert *et al.*, 2002) Syk für weitere aktinabhängige Prozesse wie die Fc γ R- und Komplement-vermittelte Phagozytose (Majeed *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006). Aktiviertes Syk erfüllt daneben wichtige Funktionen des B- und T-Zell-Rezeptors, des Fc-Rezeptors, der Lymphozyten-

differenzierung, der Mastzelldegranulation und beim Selektin-vermittelten Rollen (Turner *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 2000; Abbal *et al.*, 2006; Zarbock *et al.*, 2007).

Diesen vielfältigen Funktionen entsprechen die zahlreichen *Syk-Downstream*-Effektoren, darunter PLC γ 1 und PLC γ 2, SLP76, das Oncoprotein Cbl und der GEF Vav (Sada *et al.*, 2001; Yankee *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2006; Groesch *et al.*, 2006). Vav1 interagiert mit Syk über dessen Tyr³⁴⁸ und wird dabei phosphoryliert und aktiviert (Deckert *et al.*, 1996). Syk und Vav1 induzieren zusammen die Aktivierung der *Jun N-terminal Kinase*, der *Extracellular Signal-regulated Kinase-2*, der Kinase Akt, die Tyrosinphosphorylierung von Cbl (Miranti *et al.*, 1998) sowie im Zusammenspiel mit SLP76 die optimale Aktivierung von PAK (Oberfell *et al.*, 2001). Weiterhin sind Proteine der Vav-Familie an Prozessen der Zytoskelett-Reorganisation beteiligt (Hornstein *et al.*, 2004). Ein weiterer Interaktionspartner von Syk ist die PI3K, für die Syk in der Linkerregion an Tyr³²³ eine Bindungsstelle besitzt (Moon *et al.*, 2005; Groesch *et al.*, 2006) und deren Klasse IA-Aktivierung von Syk abhängt (Popa-Nita *et al.*, 2007).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Polarisierung und ortsgerichtete Migration von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) sind entscheidende Schritte der Rekrutierung zum Entzündungsort und damit der Funktionsfähigkeit dieser Zellen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, wie die Polarisierung und die ortsgerichtete Migration neutrophiler Granulozyten reguliert werden. Hierfür sollten vor allem funktionelle Analysen an differenzierten HL-60-Zellen (dHL-60-Zellen) vorgenommen werden.

Da bereits bekannt war, dass die Tyrosinkinase Syk eine Rolle bei der Migration spielt, sollte deren Funktion bei der Polarisierung und ortsgerichteten Migration von dHL-60-Zellen genauer charakterisiert werden. Zunächst sollte ein EGFP-gekoppeltes chimäres Syk-Protein hergestellt werden und für funktionelle fluoreszenzmikroskopische Analysen transient in dHL-60-Zellen exprimiert werden. Mit dieser Technik sollte die zeitliche und räumliche Verteilung von Syk während der Polarisierung und Migration analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der zugrunde liegende Syk-Signalweg näher charakterisiert werden. Hierzu sollte mit Hilfe einer EGFP-gekoppelten Syk-Mutante (EGFP-Syk Y323F), der die Bindungsstelle für die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) fehlt, untersucht werden, ob die Syk-vermittelte Aktivierung der PI3K von Bedeutung für die Polarisierung und ortsgerichtete Migration ist. Die subzelluläre Lokalisation der PI3K in der Syk-Mutante sollte mittels Immunhistochemie untersucht werden. Zusammen mit der Analyse der Akkumulation und Umverteilung von PI3K-Produkten in PH-Akt-GFP-Zellen nach pharmakologischer Hemmung von Syk durch Piceatannol sollte durch diese Untersuchungen geklärt werden, ob Syk eine Rolle bei der zeitlichen und räumlichen Kontrolle der PI3K spielt. Schließlich sollte die Rolle von Syk bei der Polarisierung in Syk-defizienten murinen PMN verifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die Firma Applichem, Darmstadt, lieferte Acrylamid, Coomassieblau, Dimethylsulfoxid (DMSO), EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, G418-Sulfat, Hefeextrakt, Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Ponceau S-Lösung, Salzsäure, Tetramethylethyldiamin (TEMED), Tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris), Tris-Hydrochlorid und Trypton. Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline (PBS), Fötales Kälberserum (FCS), Penicillin, Streptomycin und RPMI 1640⁺⁺ Medium wurden von Biochrom, Berlin, geliefert. Von Calbiochem, La Jolla, Kalifornien, USA, wurde Piceatannol (trans-3,3',4,5'-Tetrahydroxystilbene) bezogen. Die Firma Genaxxon Bio Science GmbH, Biberach, war Lieferant für Borsäure, Diethylpyrocarbamat (DEPC), Ethidiumbromid und Agarose. Von Gibco, Karlsruhe, stammten DNA *Typing Grade* Agarose und IMDM-Elektroporationsmedium mit 25 mM HEPES. MBI Fermentas, St.Leon-Rot, war Lieferant von Magnesiumchlorid. Trockenmilchpulver wurde bei der Firma Naturaflo, Zeven, erworben. Das Alexa 488-oder 633-konjugierte Phalloidin wurde von der Firma Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA, geliefert. Promega, Mannheim, lieferte *blue/orange* 6-fach Ladepuffer, dNTPs, Oligo-(dt) und Triton X-100. Ampicillin wurde von der Firma Roth, Karlsruhe, geliefert. Agarose, Ammoniumpersulfat, bovines Serumalbumin (BSA), Bromphenolblau, Fibrinogen (human), D(+)-Glucose, Glycin, HEPES, Kalziumchlorid, Kanamycin, N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Percoll, 50-fach TAE und Tween 20 wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen.

2.1.2. Puffer und Lösungen

Puffer und Standardlösungen wurden nach den Protokollen von Sambrook und Russel (Sambrook und Russel, 2001) unter Verwendung von gereinigtem Wasser aus einer Millipore Milli Q-Wasserreinigungsanlage zubereitet. Hitzestabile Lösungen wurden autoklaviert, alle anderen Puffer wurden mit Filtern einer Porengröße von 0,2 µm (Membrapure, Bodenheim) sterilfiltriert.

2.1.3. Antikörper

Der monoklonale, gegen humanes Syk gerichtete Antikörper von der Maus (Klon 4D10, IgG_{2a}), der polyklonale, gegen humanes bzw. murines Syk gerichtete Antikörper vom Kaninchen (N-19, sc-1077), der monoklonale Antikörper gegen die humane p85 α -Untereinheit der PI3K von der Maus (B-9, sc-1637), der polyklonale Antikörper gegen die humane p110 δ - Untereinheit der PI3K vom Kaninchen (H-219; sc-7176) sowie der polyklonale Antikörper gegen humanes C-cbl vom Kaninchen (C-15, sc-170) wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA, geliefert. Der polyklonale Antikörper gegen humanes Vav-1 vom Kaninchen wurde von der Firma Upstate, New York, NY, USA, bezogen. BD Biosciences, Palo Alto, Kalifornien, USA, lieferte den polyklonalen Antikörper gegen EGFP. Die Alexa 546- und 488- konjugierten sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG und anti-Kaninchen-IgG von der Ziege) stammten von Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA. Das sekundäre Peroxidase-gekoppelte anti-Maus-IgG von der Ziege wurde bei der Firma Sigma, Deisenhofen, erworben.

2.1.4. Zelllinien

Die Zelllinien HL-60 (humane Promyelozyten-Leukämie, ACC 3), Jurkat (humane T-Zell-Leukämie, ACC 282), PLB-985 (humane Promyelozyten-Leukämie, Derivat von HL-60; ACC 139), THP-1 (humane monozytäre Leukämie, ACC 16) und WEHI-3B (humane myelomonozytäre Leukämie, ACC 26) erhielten wir von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig. Die Zelllinie HL-60-PHAKT-GFP (Log # AN8547; Servant *et al.*, 2000) wurde freundlicherweise von Henry Bourne, *Department of Cellular and Molecular Pharmacology and Cardiovascular Research Institute, University of California*, San Francisco, USA, zur Verfügung gestellt. Die Syk-siRNA HL-60-Zellen, deren endogene Syk-Expression durch ein mittels retroviralem Gentransfer stabil eingebrachtes siRNA-Konstrukt für ca. zwei Wochen auf 38% des Ausgangswert vermindert war, wurden von Ronald Gerstl, Arbeitsgruppe Walzog, Physiologisches Institut der LMU München, hergestellt (Schymeinsky *et al.*, 2006).

2.1.5. Versuchstiere

Die Syk-knochenmarkschimären Mäuse wurden durch letale Bestrahlung des Knochenmarks mit anschließender Rekonstitution des hämatopoetischen Systems durch Syk-defiziente fötale Leberzellen (Syk^{-/-}) oder Syk-Wildtyp fötale Leberzellen (Syk^{+/-}) als Kontrolle hergestellt und freundlicherweise von Attila Mócsai, *Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine*, Budapest, Ungarn, zur Verfügung gestellt (Mocsai *et al.*, 2002).

2.1.6. Software

Folgende Programme wurden für Auswertungen und Erstellung von Abbildungen verwendet: Microsoft Office (Microsoft, Redmond, Washington, USA), Sigma Plot 8 (Systat Software, San Jose, Kalifornien, USA), Corel Draw 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada), Adobe Photoshop 7 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA).

2.2. Methoden

2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte im Thermocycler UNO II (Biometra, Göttingen) und wurde mit der Taq-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und spezifischen *Primer*-Sets (Metabion, München) durchgeführt. Die verwendeten *Primer*-Sets (siehe Tabelle 1) wurden nach Vorlagen aus Publikationen oder mit Hilfe der folgenden Software hergestellt:

<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/eprimer3.html>

<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>

PCR-Reaktiosansatz:

- 5 µl MgCl₂-freier Polymerase-Reaktionspuffer
- 5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- Je 1 µl *Primer* (0,1 µg/µl)
- 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- 1 µl cDNA (1 µg/µl)
- Auffüllen mit DEPC-Wasser *ad* 50 µl

dNTP-Mix: 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in H₂O (Promega, Mannheim)

Reaktionspuffer: 10mM Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100

DEPC-Wasser: 0,1% Diethylpyrocarbammat (DEPC) in H₂O

Amplifikat	PCR	Fragmentgröße	<i>Primer</i> in 5' - 3' - Richtung
β-Aktin	1 min 94°C 1 min 59°C 1 min 72°C 23 Zyklen	300 bp	fdw: TGTCCACCTTCCAGCAGATGTG rev: AGTCCTCGGCCACATTGTGAAC
Syk-Wildtyp	1 min 94°C 1 min 55°C 1 min 72°C 30 Zyklen	418 bp	fdw: CTGGAGAGCGAGGAGGAG rev: CTTCTTGAGGAGGCAGACCA fdw: TTCGGACTCTCCAAAGCACT rev: TTCCTGTGATTGCTCCTGTG
Syk-EGFP	1 min 94°C 1 min 56°C 1 min 72°C 30 Zyklen	620 bp	fdw: TTCGGACTCTCCAAAGCACT rev: AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
EGFP-Syk	1 min 94°C 1 min 54°C 1 min 72°C 30 Zyklen	686 bp	fdw: ACTTCAAGATCCGCCACAAC rev: CTTCTTGAGGAGGCAGACCA

Tabelle 1: PCR-Bedingungen und *Primer*-Sequenzen. Die PCR wurde mit einem initialen 2- minütigen Schmelzen bei 94°C begonnen und setzte sich wie in Spalte 2 aufgezeigt fort. Im Anschluss erfolgte ein einmaliger 10- minütiger Auffüllzyklus bei 72°C.

2.2.2. *Expand High Fidelity* Polymerase-Kettenreaktion

Der humane Syk-cDNA-Klon (RZPD Klon ID IRALp96E102Q2) wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung in Berlin bezogen. Zur Herstellung des Expressionsvektors Syk-EGFP wurde zunächst die 1,9 kb große kodierende Region von Syk mit Hilfe des *Expand High Fidelity* PCR-Kits (Invitrogen, Karlsruhe) und der *Primer* 5'-ATCGAATTCGAAGCATGGCCAGCAGC-3' und 5'-CGGTACCAAGTTCACCACGTCATAGTAGTAA-3' (Metabion, München) nach Angaben des Herstellers amplifiziert. Für die Generierung des EGFP-Syk-Konstruktes wurde die kodierende Region von Syk unter Verwendung der *Primer* 5'-ATCGAATTCGAAGCATGGCCAGCAGC-3' und 5'-CTGTGATCAAAGGCACCACT GGTACCG-3' amplifiziert. Die *Primer* wurden jeweils so gewählt, dass die aus den Amplifikationen resultierende Syk-cDNA Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Eco RI und KpnI enthielt. Die *Expand High Fidelity* PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt (30 s

Denaturierung bei 94°C, *Primer*-Anlagerung bei 55°C sowie einminütige Synthese bei 68°C).

Reaktionsansatz für die *High Fidelity* PCR (Invitrogen, Karlsruhe):

- 5 µl 10-fach *High Fidelity* PCR-Puffer
- 10 mM dNTP-Mix
- 50 mM MgSO₄
- Je 10 µM *Primer* (Metabion, München)
- 1 µg cDNA
- 0,2 µl Platinum Taq *High Fidelity*
- Auffüllen mit *Aqua dest.* ad 50 µl

2.2.3. Zielgerichtete Mutagenese

Die EGFP-markierte Syk Y323F-Mutante wurde durch zielgerichtete Mutagenese aus dem nicht-mutierten EGFP-Syk-Plasmid generiert. Hierfür wurde der *QuickChange* Mutagenese-Kit (Stratagene, CedarCreek, USA) und die *Primer* 5'-TGTCATTCAATCCGTTTGAGCCAGAACTTGG-3' und 5'-CCAAGTTCTGGCTCAAACGGA TTGAATGACA-3' (Metabion, München) verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Einbringung der erwarteten Mutation wurde durch automatisierte DNA-Sequenzierung (Medigenomix, Martinsried) bestätigt.

2.2.4. DNA-Analyse

Für die Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA und der durch die *High Fidelity* PCR amplifizierten Syk-cDNA wurden Enzyme der Firma New England Biolabs, Schwalbach, mit dem darauf abgestimmten, aus vier Basispuffern bestehenden Puffersystem verwendet:

Puffer 1: 10 mM Tris/HCl (pH 7) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT

Puffer 2: 10 mM Tris/HCl (pH 8) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 50 mM NaCl

Puffer 3: 50 mM Tris/HCl (pH 7.9) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 100 mM NaCl

Puffer 4: 20 mM Tris/HCl (pH 7.9) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT + 50 mM KAc

Reaktionsansatz:

- 2 µl 10-fach Puffer (nach Herstellerangabe)
- 1 µg DNA
- je 1 µl Restriktionsendonuklease (10 U)
- Auffüllen mit *Aqua dest.* ad 20 µl

Die Ansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert und die Enzyme anschließend bei 65°C für 20 min inaktiviert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.5.).

2.2.5. DNA-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufzutrennen, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese in einer Horizontalelektrophorese-Apparatur (BioRad, München) durchgeführt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 1,5%ige Agarosegele eingesetzt. Den Gelen wurde 0,002% Ethidiumbromid zugegeben, um die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht zu ermöglichen. Die aufzutragende DNA wurde mit 5-fachem DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:5 versetzt und in die Taschen des Gels eingebracht. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Die angelegte Spannung und Laufzeit variierten je nach Größe und Konzentration der Agarosegele zwischen 70 bis 140 V bei einer Dauer von 0,5 bis 3 h. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurden folgende DNA-Größenstandards (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) mitgeführt: 100 bp DNA-Leiter (100-1000 bp) und 1 kbp DNA-Leiter (ab 500 bp).

10-fach TBE-Puffer: 10,8% Tris (pH 8); 5,5% Borsäure; 0,93% EDTA in H₂O

Agarose-Gel: 0,8-1,5% Agarose in TBE; 0,002% Ethidiumbromid

5-fach DNA-Ladepuffer: 50% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylenzyanol; 5-fach TBE-Puffer

2.2.6. DNA-Extraktion aus Agarosegel

Zur Isolation von DNA-Fragmenten nach der Behandlung mit Restriktionsenzymen wurden der Reaktionsansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente unter einer UV-Lampe (366 nm; Biometra, Göttingen)

mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter Verwendung des QIAEX II Agarose-Gel-Extraktion-Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers wiedergewonnen. Hierzu wurden die Gelstücke mit Puffer QX1 (Solubilisierungspuffer mit hoher Elektrolytkonzentration) im Verhältnis 1:3 und mit 10 µl QIAEX II (Silicagelkugeln) versetzt. Es folgte eine 10- minütige Inkubation bei 50°C unter mehrmaligem Mischen, woran sich eine Zentrifugation (30 s, 10000 x g) anschloss. Agarosereste wurden durch Waschen des Pellets mit 500 µl Puffer QX1 entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl des ethanolhaltigen PE-Puffers wurde das Pellet luftgetrocknet, in 20 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die gereinigte DNA wurde durch Abzentrifugieren der Silicakugeln für 30 s bei 10000 x g und Überführen des Überstands in ein neues Gefäß erhalten.

2.2.7. DNA-Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die Quick T4-DNA-Ligase der Firma New England Biolabs, Schwalbach, verwendet. In einen Ligationsansatz wurden 1 - 2 µg *Insert*-DNA eingesetzt. Die Menge an Vektor-DNA (EGFP-Expressionsvektoren der Firma Clontech, BD New York, USA) wurde auf ein Vektor-*Insert*-Verhältnis von 1:3 abgestimmt. Der Ansatz aus Vektor und *Insert* wurde mit 10 µl 2-fachem Ligationspuffer und 1 µl Quick T4-DNA-Ligase versetzt und mit *Aqua* dest. auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 17°C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Parallel zu jeder Ligationsreaktion wurde eine Kontrolle mit Vektor und T4-DNA-Ligase, aber ohne *Insert*-DNA mitgeführt, welche nach der Transformation (siehe Kapitel 2.2.8.) die Zahl der Kolonien anzeigte, die auf eine Selbstligation des Vektors zurückzuführen waren.

2-fach Ligationspuffer (New England Biolabs, Schwalbach): 132 mM Tris-HCl; 20 mM MgCl₂; 2 mM Dithiothreitol; 2 mM ATP; 15% Polyäthylenglycol (PEG 6000), pH 7,6

2.2.8. Transformation von E.coli

Für die Transformation wurde ca. 1 µg Vektor-DNA mit 100 µl kompetenten DH5- α -*E.coli*-Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert, woran sich ein Hitzeschock (90 s bei 42°C) anschloss. Nachdem die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt waren, wurden 900 µl Antibiotika-freies LB-Medium zugegeben. Der Ansatz wurde 45 min bei 37°C geschüttelt, um den transformierten Bakterien die nötige Zeit für die Ausbildung der Antibiotikaresistenz zu geben. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Bakterien in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte, welche das für die Selektion notwendige Antibiotikum (Kanamycin 25 µg/ml oder Ampicillin 50 µg/ml) enthielt, ausplattiert. Die transformierten Zellen wuchsen bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht zu Kolonien heran.

LB-Medium: 25 g Trypton; 12,5 g Hefe; 25 g NaCl; Kanamycin (25 µg/ml) oder Ampicillin (50 µg/ml) in 2,5 l *Aqua dest.*

2.2.9. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die verwendete Methode zur Isolation kleinerer Mengen Plasmid-DNA durch alkalische Lyse mit SDS basiert auf einem Protokoll von Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001). Hierzu wurden 3 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium (Kanamycin 25 µg/ml) mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und im Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot (1,5 ml) der Übernachtskultur wurde 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 µl eiskalter Lösung 1 suspendiert. Nach 5- minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten die Zelllyse und die Denaturierung der DNA durch Zugabe von 200 µl frisch hergestellter Lösung 2. Nach vorsichtigem Mischen wirkte diese 5 min auf Eis auf die Zellen ein und wurde anschließend durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 und abermaligem Mischen neutralisiert. Nach 5- minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden bei 10000 x g für 5 min die ausgefallenen Proteine, chromosomale DNA und SDS abzentrifugiert. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und zur Ausfällung der DNA mit dem 2,5-fachen Volumen eiskalten 100%igen Ethanol versetzt. Nach 2- minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung gemischt, ein weiteres Mal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen,

luftgetrocknet und in TE-Puffer (pH 8) mit 20 µg/ml RNase A (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

Lösung 1: 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl in *Aqua dest.* (pH 8,0)

Lösung 2: 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS in *Aqua dest.* (frisch angesetzt)

Lösung 3: 60 % 5 M Kaliumacetat; 28,5 % *Aqua dest.*; 11,5 % abs. Essigsäure (pH 5,8)

TE-Puffer: 10-fach Tris-EDTA; 100 mM Tris-Cl; 10 mM EDTA (pH 8)

2.2.10. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das *EndoFree Plasmid Purification Kit* der Firma Quiagen, Hilden, verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Hierzu wurden 3 ml LB-Medium (25 µg/ml Kanamycin) als Vorkultur mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde in 500 ml LB-Medium (25 µg/ml Kanamycin) gegeben und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in einem 250 ml Beckman-Zentrifugengefäß bei 6000 x g 15 min bei 4°C sedimentiert und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Dem Ansatz wurden 10 ml Puffer P2 zugefügt, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Präzipitation wurden 10 ml Puffer P3 (4°C) zugegeben und gemischt. Das Lysat wurde in den Spritzenkörper der QIAfilter Filtrationseinheit gegossen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Zell-Lysat in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen filtriert. Zum filtrierten Lysat wurden 2,5 ml Puffer ER pipettiert, durch 10-maliges Invertieren des verschlossenen Röhrchens gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Eine QIAGEN-tip-500-Säule wurde mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Das filtrierte Lysat wurde auf die QIAGEN-tip-Säule gegeben, welche anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen wurde. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QN aus der Säule eluiert. Zur Präzipitation der DNA aus dem Eluat wurden 10,5 ml Isopropanol (Raumtemperatur) zugegeben, gemischt und bei 15000 x g und 4°C 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml endotoxinfreiem 70%igem Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen, für 10 min bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert, anschließend 10 min luftgetrocknet und in 500 µl endotoxinfreiem TE-Puffer (pH 8) resuspendiert. Plasmid-DNA wurde bei -20°C

gelagert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte in einer Quarzküvette mit einem Photometer der Firma Pharmacia Biotech, Rochester, USA, bei einer Absorption von 280 nm. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel: Konzentration (DNA) $\mu\text{g}/\mu\text{l} = E_{280} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50/1000$

2.2.11. mRNA-Isolierung

RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit einem RNA-Isolierungs-Kit (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Präparation erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Für Puffer und Lösungen wurde deshalb DEPC-Wasser (0,1%) verwendet. Die Zellen (5×10^6) wurden bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert und das Pellet mit 600 μl eiskalter Denaturierungslösung versetzt. Anschließend wurden 60 μl einer 2 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde mit 600 μl der unteren organischen Phase eines Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohols (99:24:1, pH 4,7) versetzt, wiederum gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei $10000 \times g$ für 20 min bei 4°C wurde die wässrige RNA-haltige Phase in ein neues Gefäß überführt. Um die RNA-Präzipitation herbeizuführen, wurde das gleiche Volumen 100%igen Isopropanols zugegeben und die Mischung 20 min bei -20°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 10 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte RNA mit eiskaltem 75%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in einer RNase-freien Umgebung 10 min luftgetrocknet und in Nuklease-freiem Wasser mit 1 μl RNase Inhibitor (Promega, Mannheim) resuspendiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert. Die Konzentration der mRNA wurde in einer Quarzküvette mit einem Photometer der Firma Pharmacia Biotech, Rochester, USA, bei einer Absorption von 260 nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel: Konzentration (RNA) $\mu\text{g}/\mu\text{l} = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40/1000$

DEPC-H₂O: 0,1% Diethylpyrocarbammat (DEPC) in H₂O. DEPC-H₂O wurde zweimalig autoklaviert, um das DEPC zu inaktivieren.

2.2.12. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription werden durch eine reverse Transkriptase freie Oligonukleotide (dNTPs) als Komplementärstrang zu einer einzelsträngigen RNA

ergänzt, aus welcher auf diese Weise eine doppelsträngige cDNA synthetisiert wird. Als Standard-*Primer* wird ein Anti-Poly-A-*Primer* (Oligo(dt)₁₅, Promega, Mannheim) verwendet. Zur Gewinnung von cDNA aus der mRNA eukaryotischer Zellen wurde der M-MLV-Reverse-Transkriptase-Kit (Promega, Mannheim) verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Hierzu wurden 2 µg der jeweiligen mRNA und 1 µl Oligo(dt)₁₅-*Primer* (0,5 µg/µl) zum Auflösen von Sekundärstrukturen 5 min bei 70°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und folgende Reagenzien in der unten angegebenen Reihenfolge hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 37°C.

- 5 µl M-MLV-Reaktionspuffer
- 5 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 0,5 µl rRNasin (40 U/l)
- 1 µl M-MLV-reverse Transkriptase (200 U/µl)
- 13,5 µl DEPC-H₂O.

dNTP-Mix: 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in H₂O (Promega, Mannheim)

Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT (Promega, Mannheim)

DEPC-Wasser: 0,1% Diethylpyrocarbam (DEPC) in H₂O

2.2.13. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurden je 10⁶ Zellen (HL-60, Jurkat, THP-1, und PLB-895) in 40 µl Laemmli-Puffer für 5 min bei 100°C lysiert. Durch kurzes Zentrifugieren wurde nicht gelöstes Material abgetrennt. Die Gelelektrophorese von Proteinen wurde in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (10% (w/v) Acrylamid) unter denaturierenden Bedingungen in einer Elektrophoreseapparatur der Firma BioRad, München, bei konstanter Spannung von 100 V durchgeführt. Die Proben und ein entsprechender Proteinstandard wurden dazu in die Taschen des Gels aufgetragen.

3-fach Laemmli-puffer: 6% (w/v) SDS; 18% 2-Mercaptoethanol; 30% (v/v) Glycerol und 0,02% Bromphenolblau in 600 mM Tris-HCl (pH 6,8)

10-fach Tris-Glycin SDS Elektrophoresepuffer: 1,92 M Glycin; 0,1% SDS; 250 mM Tris in H₂O

SDS-Trenngel: 8% Acrylamid; 0,375 M Tris/HCl (pH 8,9); 0,1% SDS; 0,05% Ammoniumpersulfat; 0,05% TEMED in H₂O

SDS-Sammelgel: 3% Acrylamid; 125 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,1% SDS; 0,05% Ammoniumpersulfat; 0,05% TEMED in H₂O

Proteinstandard: *Elektrophoresis prestained SDS-7B Molecular weight marker* (Sigma, Deisenhofen):

26, 6 KDa Triphosphat Isomerase, Kaninchenmuskel

36,5 KDa Laktatdehydrogenase, Kaninchenmuskel

48,5 KDa Fumarase, Schweineherz

58 KDa Pyruvatkinase, Hühnermuskel

84 KDa F-6-Phosphatkinase, Kaninchenmuskel

110 KDa β -Galktosidase, *E.coli*

80 KDa α -Makroglobulin, humanes Plasma

2.2.14. Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe der Westernblot-Technik zur immunologischen Analyse auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer „*semidry*“ Western-Blot-Apparatur (Biotec-Fisher, West Peth, Australien) bei 150 mA für 1,5 h. Durch kurze Färbung der Membran mit Ponceau S bei Raumtemperatur wurde geprüft, ob in jeder Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen worden war. Überschüssiger Farbstoff wurde mit H₂O gewaschen. Die aufgetrennten und auf Nitrozellulose-Membran transferierten Proteine wurden nun mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

Ponceau S Lösung: Ponceau S 20 mg/ml in H₂O

2.2.15. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose

Vor der Inkubation mit dem monoklonalen, gegen humanes Syk gerichteten Antikörper von der Maus (Klon 4D10, IgG_{2a}) in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml oder dem polyklonalen Antikörper gegen EGFP in einer Verdünnung von 1:200 in Tris-gepufferter Saline mit 0,1% Tween-20 (TBST) und mit 3% Trockenmilch für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Filter zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Trockenmilch in TBST für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem

Waschen in TBST wurden die Filter 1 h mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper (Sigma, Deisenhofen) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST mit 3% Trockenmilch inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen. Die Detektion wurde mit Chemolumineszenz unter Verwendung des *Enhanced ChemiLuminescence*-Kit von Amersham Life Science (Braunschweig) durchgeführt. Die Lumineszenz wurde mit einem Hamamatsu-Photonen-Detektionssystem, das die Orca-Kamera (Hamamatsu 1394 ORCA-ERA), die Aequoira-Dunkelkammer und die Wasabi-Software (Hamamatsu Photonics, Herrsching) enthält, ausgewertet. Für die Wiederverwendung wurde die Membran mit einer *Stripping*-Lösung für 30 min bei 50°C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit TBST gewaschen.

TBS: 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,3 %Tris Base in H₂O

TBST: TBS mit 0,1% Tween 20

Stripping-Lösung: 100 mM 2-Mercaptoethanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris (pH 6,7)

2.2.16. Zellkultur

Die humane promyelozytische Zelllinie HL-60 (ACC 3), die humane T-Zelllinie Jurkat (ACC 282), die humane promyelozytische Zelllinie PLB-985, die humane monozytische Zelllinie THP-1 und die myelomonozytäre Zelllinie WEHI-3B wurden in RPMI Medium 1640⁺⁺, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt war, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für eine PMN-ähnliche Differenzierung der HL-60 Zellen (dHL-60-Zellen) wurden die Zellen nach Einstellung der Zelldichte auf 10⁶/ml in Anwesenheit von 1,3% DMSO sechs Tage lang kultiviert. Die Zelllinie HL-60-PHAKT-GFP (Log # AN8547) wurde in RPMI Medium 1640⁺⁺ in Anwesenheit von 1 mg/ml G418-Sulfat kultiviert und entsprechend den HL-60-Zellen differenziert. Vor ihrer Verwendung wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen.

2.2.17. Isolierung muriner neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark

Murine PMN wurden aus Femur und Tibia von Syk^{+/-} und Syk^{-/-} knochenmarkschimären Mäusen gewonnen. Hierzu wurden die Knochenmarkszellen auf einen

diskontinuierlichen PercollTM-Gradienten (52%, 64%, 72%) gegeben und bei 1000 x g für 30 min zentrifugiert. PMN wurden aus der 64%/72%-Intersphäre gesammelt, in PBS gewaschen und zur Differenzierung 24 h in RPMI Medium 1640⁺⁺ mit 20% WEHI-3B-konditioniertem Medium (Interleukin-3-haltig) kultiviert. Die im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmte PMN-Vitalität war > 95%; die unter dem Mikroskop unter Verwendung einer HemacolorTM-Färbung gemessene Reinheit betrug > 98% (Merck, Darmstadt).

2.2.18. Transiente Transfektion hämatopoetischer Zelllinien durch Elektroporation

Die Zellen (2×10^7 /ml) wurden in eiskaltem IMDM-Medium, das 25 mM HEPES enthielt, suspendiert. Ein Aliquot (400 µl) der Zellsuspension (8×10^6 Zellen) wurde in eine Elektroporationsküvette (*Gene Pulser Cuvette* mit einer 0,4 cm Elektrode, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) überführt und mit 30 µg endotoxinfreier Vektor-DNA, die in 30 µl sterilem Wasser gelöst war, gemischt. Daraufhin wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einem EasyJect T+ Elektroporator (Equibio, Kent, Großbritannien) elektroporiert. Als Einstellungen wurden 290 µV und 1050 µF gewählt, woraus sich eine Zeitkonstante von ca. 30 ms ergab. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in 5 ml RPMI Medium 1640⁺⁺ mit 10% fötalem Kälberserum gegeben. Frühestens nach 4 h wurden die Zellen für funktionelle und biochemische Analysen verwendet.

2.2.19. Adhäsionsassay

Für die Analyse der Zelladhäsion und Polarisation wurden transfizierte oder untransfizierte dHL-60-Zellen oder murine PMN ($0,5 - 1 \times 10^5$) in Adhäsionsmedium suspendiert. Die dHL-60-Zellen und die murinen PMN wurden auf Fibrinogen-beschichtete (250 µg/ml Fibrinogen, 1 h bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4°C über Nacht) Deckglasplättchen (Saur, Reutlingen) gegeben. Um Syk zu hemmen, wurden die Zellen vor der Adhäsion für 30 min in PBS mit 0,1% BSA und 0,1% Glukose in Anwesenheit von 30 µM in DMSO gelösten Piceatannols bei 30°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit 30 µM Vehikel (DMSO) unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Deckglasplättchen mit den Zellen wurden 5 min bei 37°C inkubiert. Vor der Stimulation erfolgte ein Waschschrift mit auf 37°C vorgewärmtem

Adhäsionsmedium. Die dHL-60 wurden 30 min mit 100 nM fMLP, murine PMN mit 10 μ M fMLP bei 37°C stimuliert und anschließend fixiert. Alternativ wurden die Zellen nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C für funktionelle Analysen durch Zeitrafferaufnahmen verwendet.

Adhäsionsmedium: 0,25% BSA; 0,1% Glukose; 1,2mM Ca^{2+} ; 1 mM Mg^{2+} (in PBS)

2.2.20. Migrationsassay

Die Migrationsexperimente mit dHL-60-Zellen wurden in IBIDI μ -Kammern (IBIDI, München), die mit Fibrinogen (250 μ g/ml) für 1 h bei Raumtemperatur beschichtet worden waren, durchgeführt. Die Zellen (10^7) wurden in den Kanal der IBIDI μ -Kammer gegeben (Kanalgröße: 5 \times 0,4 \times 50 mm³; Kanalvolumen: 100 μ l) und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kammer mehrmals mit warmem Adhäsionsmedium unter Vermeidung turbulenter Strömung gespült. Um die Migration zu induzieren, wurden 30 μ l des Chemotaxins (10 nM fMLP in Adhäsionsmedium, das mit 0,01% Dextranblau gefärbt war) auf einer Seite des Kanals zugegeben. Die Zugabe des Chemotaxins führte zu einem blau gefärbten Bogen, der die Stabilität des Gradienten (1-2 h) anzeigte.

2.2.21. Mikroskopische Fluoreszenz- und Video-Zitraffer-Analysen

Nach Induktion der Adhäsion wie in Kapitel 2.2.19. beschrieben, wurden die Zellen zweimal mit warmem Adhäsionsmedium gewaschen und anschließend mit 3,7% Formaldehyd in Adhäsionsmedium für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 0,2% Tween in PBS für 2 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit 1% BSA in PBS bei 4°C über Nacht inkubiert. Die indirekte Fluoreszenzfärbung von Syk wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Syk von der Maus (Klon 4D10, IgG_{2a}) oder einem polyklonalen Antikörper gegen humanes bzw. murines Syk vom Kaninchen (N-19, sc-1077) in einer Verdünnung von jeweils 1:200 für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die indirekte Fluoreszenzfärbung von Vav erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper gegen humanes Vav-1 vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht bei 4°C. Cbl wurde durch Inkubation mit dem polyklonalen

Antikörper gegen humanes Cbl (C-15, sc-170) vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:100 bei 4°C über Nacht indirekt fluoreszenzgefärbt. Ebenfalls bei 4°C über Nacht und einer Verdünnung von 1:100 erfolgte die indirekte Fluoreszenzfärbung der PI3K p85 α mit einem monoklonalen Antikörper gegen die humane p85 α -Untereinheit der PI3K von der Maus (Klon B-9, sc-1637) und der PI3K p110 δ mit einem polyklonalen Antikörper gegen die humane p110 δ -Untereinheit der PI3K vom Kaninchen (H-219; sc-7176). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Alexa 546- oder 488-konjugierten sekundären Antikörpern in einer Verdünnung von 1:400 1 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit gefärbt. Für die F-Aktin-Färbung wurden die Zellen mit Alexa 488- oder 633-konjugiertem Phalloidin in einer Verdünnung von 1:40 für 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach dem Färbevorgang wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Die konfokale Mikroskopie wurde mit einem 63 \times /1,2 Wasser-DIC-Objektiv und einem LSM 410/Axiovert 135M Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Anregung der Epifluoreszenz (grün) erfolgte bei 488 nm, die Detektion mit einem Bandpass (BP) von 510 bis 525 nm. Die Exzitation der roten Fluoreszenz erfolgte bei 543 nm, die Detektion erfolgte mit einem 560 nm Langpass. Weitere Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit einem Zeiss 200M Mikroskop (Zeiss, Göttingen) bei einer Xenon-Lampenanregung (Filterset 13: BP 470/20; *Beamsplitter* FT 495 nm) und einer Emissionsdetektion mit einem BP von 505 bis 530 nm (grün), bzw. einer Anregung (Filterset 20: BP 546/12; *Beamsplitter* FT 560 nm) und einer Emissionsdetektion mit einem BP von 575 bis 640 nm (rot). Zeitraffer-Videomikroskopie-Aufnahmen wurden mit dem Zeiss 200M Mikroskop unter Verwendung eines Plan-Apochromat 63 \times /1,4 N_A Öl-Objektivs (Zeiss, Göttingen), einer AxioCam HR-Digitalkamera (Zeiss, Göttingen) und der AxioVision 4 Software (Zeiss, München-Hallbergmoos) durchgeführt.

2.2.22. Statistische Analyse

Die Statistische Analyse wurde mit Hilfe des Student's t-Test (Sigma Plot, Systat Software, San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt. Bei $p < 0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung der Expressionsvektoren

Um die funktionelle Bedeutung von Syk bei der Migration und die räumliche und zeitliche Umverteilung von Syk in lebenden Leukozyten genauer analysieren zu können, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit verschiedene Syk-Expressionsvektoren (Abb. 6) hergestellt und charakterisiert. Mit Hilfe dieser Vektoren wurden verschiedene Fusionsproteine aus dem "Enhanced green fluorescent Protein" (EGFP) und Syk in hämatopoetischen Zelllinien exprimiert (siehe Kapitel 3.2.) und sowohl biochemisch (siehe Kapitel 3.3.) als auch funktionell (siehe Kapitel 3.4.) charakterisiert. EGFP dient hierbei als Reporterogen, dessen Epifluoreszenz in lebenden Zellen detektiert werden kann. Die Expression von EGFP ist ein in der molekularen Zellbiologie etabliertes System, das zur Analyse verschiedenster Zellfunktionen verwendet wird und in der Regel ungiftig für die Zelle ist (Arun *et al.*, 2005). Mögliche Auswirkungen einer Überexpression von EGFP-Syk auf die Funktionalität der Zellen wurden in dieser Arbeit jedoch gesondert überprüft (siehe Kapitel 3.4.).

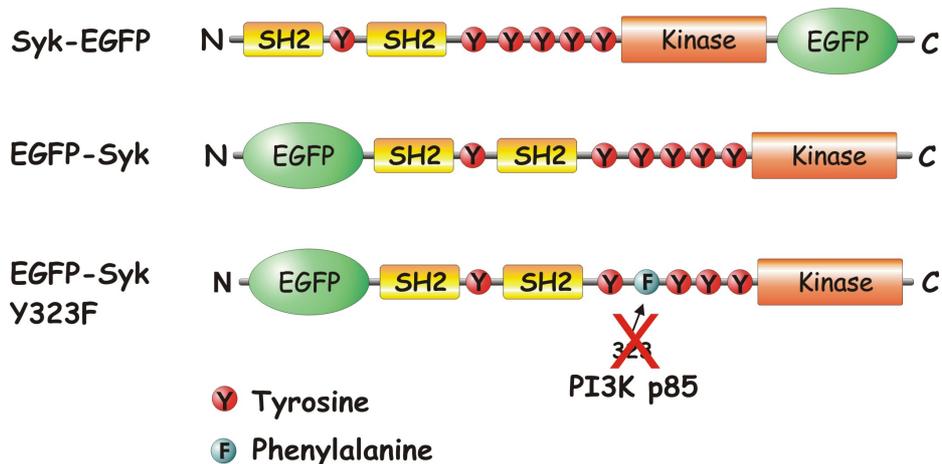


Abb. 6: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren Syk-EGFP, EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F. Die Abbildung zeigt die hergestellten Konstrukte sowie die Bindungsstelle für die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) an Syk (Tyr³²³).

Um die funktionelle Bedeutung des Tyrosinrestes 323 in der Linkerregion von Syk für die Migration näher zu charakterisieren, wurde durch gezielte Mutagenese dieser Tyrosinrest durch Phenylalanin ersetzt (Abb. 6) und somit ein EGFP-gekoppeltes

Syk-Konstrukt erstellt (EGFP-Syk Y323F), dem die Bindungsstelle für die regulatorischen Untereinheiten p85 α und p85 β der PI3K Klasse IA fehlt (Moon *et al.*, 2005). Zur Herstellung der Syk-EGFP- und EGFP-Syk-Chimären wurde die kodierende Region aus der humanen Syk-cDNA in entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Hierdurch wurden Vektoren für die Expression der Fusionsproteine Syk-EGFP (EGFP am N-Terminus von Syk) und EGFP-Syk (EGFP am C-Terminus von Syk) generiert, welche durch DNA-Restriktionsanalysen auf ihre richtige Zusammensetzung überprüft wurden (Abb. 7).

Restriktionsanalyse der Expressionsvektoren Syk-EGFP und EGFP-Syk

Um die erfolgreiche Klonierung der Expressionsvektoren und die richtige Zusammenstellung der Konstrukte zu prüfen, wurde die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation und Restriktionsendonukleasen untersucht. Die Expressionsvektoren wurden hierzu mit folgenden Enzymen in unterschiedlicher Zusammenstellung geschnitten: Eco RI, Bgl II, Not I und Kpn I (schematische Darstellung der Schnittstellen an den Vektoren siehe Abb. 7A, Zusammenstellung der Restriktionsendonukleasen siehe Abb. 7B). Die einfache Restriktion mit Eco RI oder Kpn I führte zur Linearisierung des Vektors und ergab ein 6,6 Kb großes DNA-Fragment. Durch die Restriktion mit Eco RI/Kpn I wurde das 1,9 Kb große Insert aus dem Vektor (4,7 Kb) geschnitten, so dass dessen korrekte Einbringung bestätigt werden konnte. Die Schnittstellen von Bgl II liegen innerhalb des Inserts, während Not I EGFP vom Vektor trennt. Durch die Restriktion mit Kpn I und Not I wurde dadurch EGFP (0,7 Kb) als Schnittstück erhalten. Die Größe der so erhaltenen Fragmente ist in Abb. 7A angegeben. In Abb. 7B ist die Ethidiumbromidfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA zu sehen. Die Abbildung zeigt, dass alle DNA-Fragmente die erwartete Größe aufwiesen. Somit konnte durch die Restriktionsanalyse der Expressionsvektoren Syk-EGFP und EGFP-Syk die korrekte Zusammensetzung beider Konstrukte nachgewiesen werden.

3.2. Transiente Transfektion hämatopoetischer Zelllinien mit den Expressionsvektoren Syk-EGFP, EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F

Um die hergestellten Expressionsvektoren für funktionelle Untersuchungen verwenden zu können, wurde die Transfektion verschiedener hämatopoetischer

Zelllinien (HL-60, Jurkat, THP-1 und PLB-985) mit Syk-EGFP, EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F mittels Elektroporation etabliert.

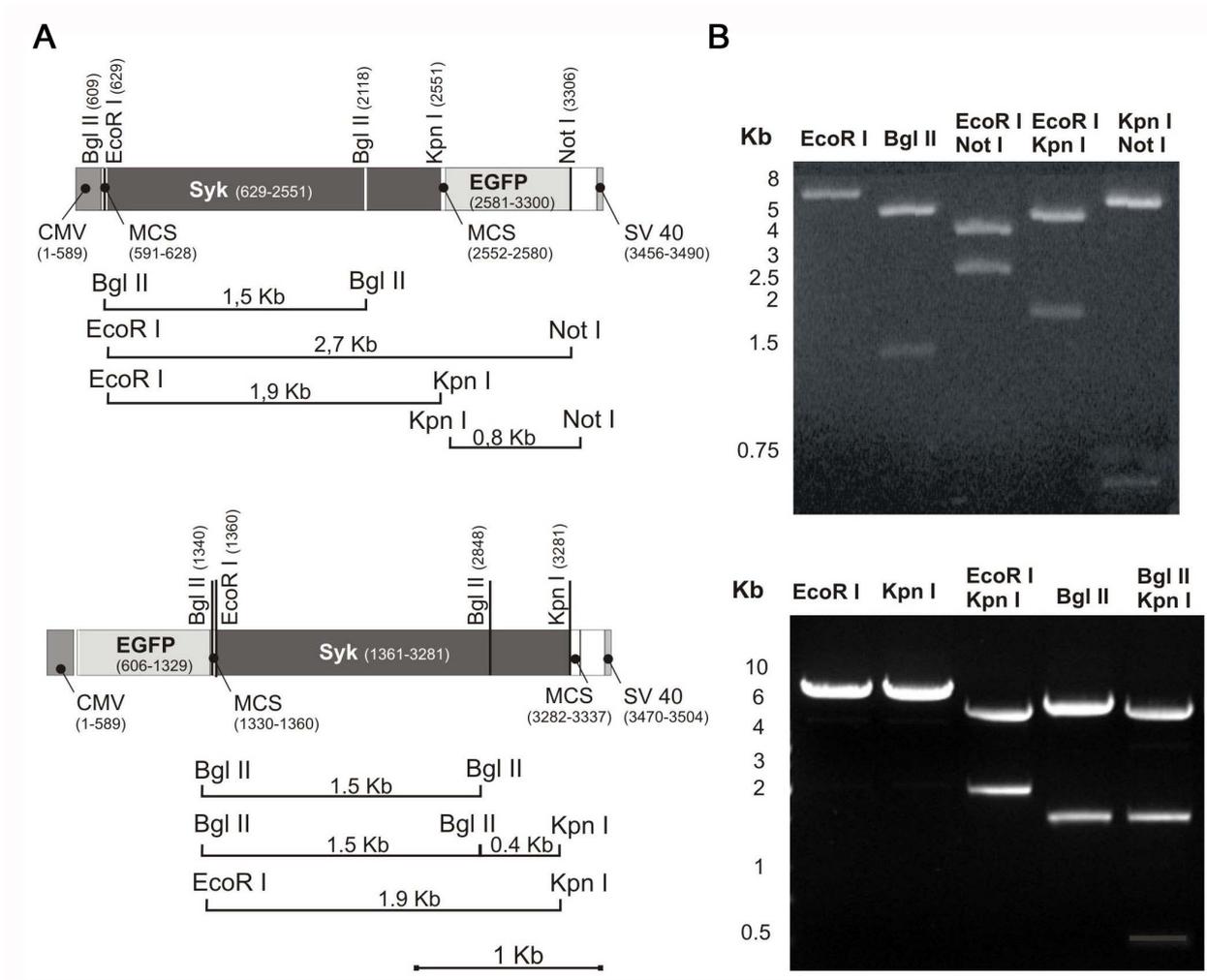


Abb. 7: Restriktionsanalyse der Expressionsvektoren Syk-EGFP und EGFP-Syk. (A) Schematische Darstellung der Vektorteilstücke von Syk-EGFP (oben) und EGFP-Syk (unten) mit den Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen Eco RI, Bgl II, Not I, Kpn I, dem CMV-Promotor, der *Multiple Cloning Site* (MCS), dem klonierten Syk-Fragment, dem EGFP und dem Poly-A-Schwanz (SV 40). Angabe der Größe der resultierenden Restriktionsprodukte jeweils unter dem Konstrukt. Maßstab: 1 kb. **(B)** Je 1 µg der Expressionsvektoren Syk-EGFP (oben) und EGFP-Syk (unten) wurde mit folgenden Enzymen verdaut: Eco RI, Bgl II, Eco RI/Not I, Eco RI/Kpn I, Kpn I/Not I bzw. Eco RI, Kpn I, Eco RI/Kpn I, Bgl II, Bgl II/Kpn I. Der Reaktionsansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Als Positivkontrolle diente die Elektroporation mit dem Vektor EGFP-C1, als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Plasmid pcDNA 3.1, das zwar den CMV-Promoter, aber nicht GFP enthielt, transfiziert. Die Effizienz der Transfektionen wurde durch Auszählen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt und betrug in einem repräsentativen Experiment bei den mit EGFP-C1 transfizierten dHL-

60-Zellen 23%. Eine etwas geringere Fluoreszenz wiesen die mit EGFP-Syk (7%) oder EGFP-Syk Y323F (11%) transfizierten Zellen auf. Jurkatzellen zeigten bei der Transfektion mit EGFP-C1 (34%) und EGFP-Syk (25%) eine etwas höhere Transfektionseffizienz als dHL-60-Zellen (Abb. 8). Im Gegensatz dazu glichen die Fluoreszenzeigenschaften der mit Syk-EGFP transfizierten Zellen der Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt), so dass für funktionelle Analysen der Expressionsvektor EGFP-Syk verwendet wurde. Weiterhin zeigte sich, dass elektroporierte Zellen innerhalb von 4 bis 6 h nach der Transfektion die beste Funktionalität bei bereits ausreichender Fluoreszenz aufwiesen. Daher wurden durch Elektroporation transfizierte Zellen in diesem Zeitraum für funktionelle Analysen verwendet.

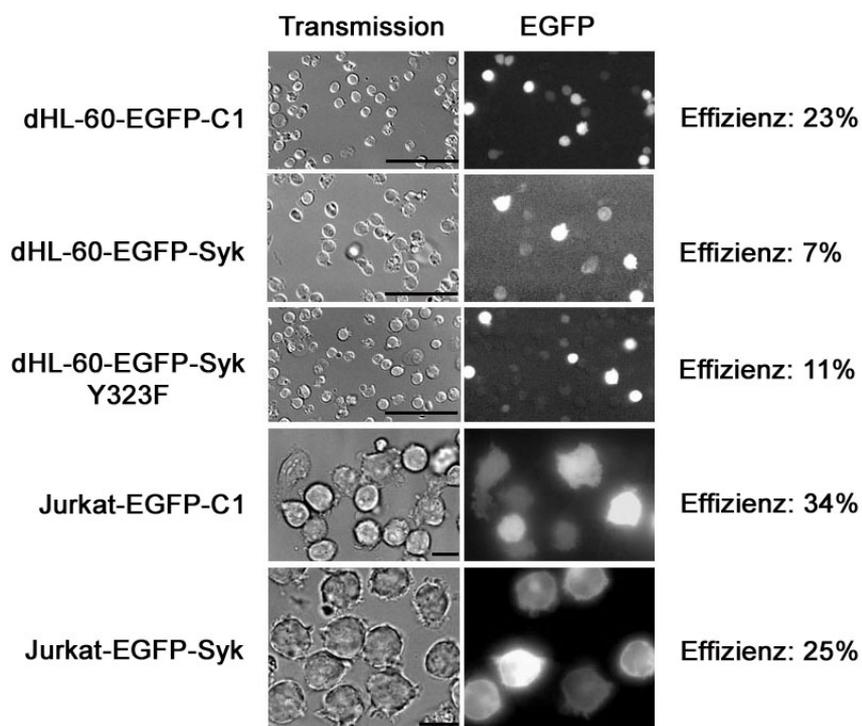


Abb. 8: Herstellung transienter Transfektanten durch Elektroporation. Die dHL-60- und Jurkat-Zellen wurden mit jeweils 30 µg des Expressionsvektors EGFP-C1, EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F mittels Elektroporation transfiziert. Durch Auszählen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Transfektionseffizienz bestimmt; Marker = 100 µm (dHL-60) bzw. 10 µm (Jurkat). Die gezeigten Ergebnisse stammen aus einem Experiment, das repräsentativ für drei unabhängige Experimente ist.

3.3. Expressionsanalyse der Transfektanten

Analyse der mRNA-Expression verschiedener Transfektanten

Um die Transfektanten biochemisch zu charakterisieren, wurde zunächst deren Syk-mRNA-Expression mit Hilfe der reversen Transkription und Polymerase-

Kettenreaktion (RT-PCR) analysiert. Zur Analyse der Expression von endogenem Syk in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen wurde ein RT-PCR-Protokoll etabliert, mit dessen Hilfe die Syk-Wildtyp-mRNA nachgewiesen werden konnte. Mit den *Primern* 3'-Syk-rev und 3'-Syk-fdw, deren Bindungsstellen in der Kinasedomäne von Syk bzw. in der 3'-nicht-translatierten Region liegen (Abb. 9A), wurde ein 418 bp großes PCR-DNA-Fragment generiert. Hierdurch konnte endogenes Wildtyp-Syk eindeutig nachgewiesen werden.

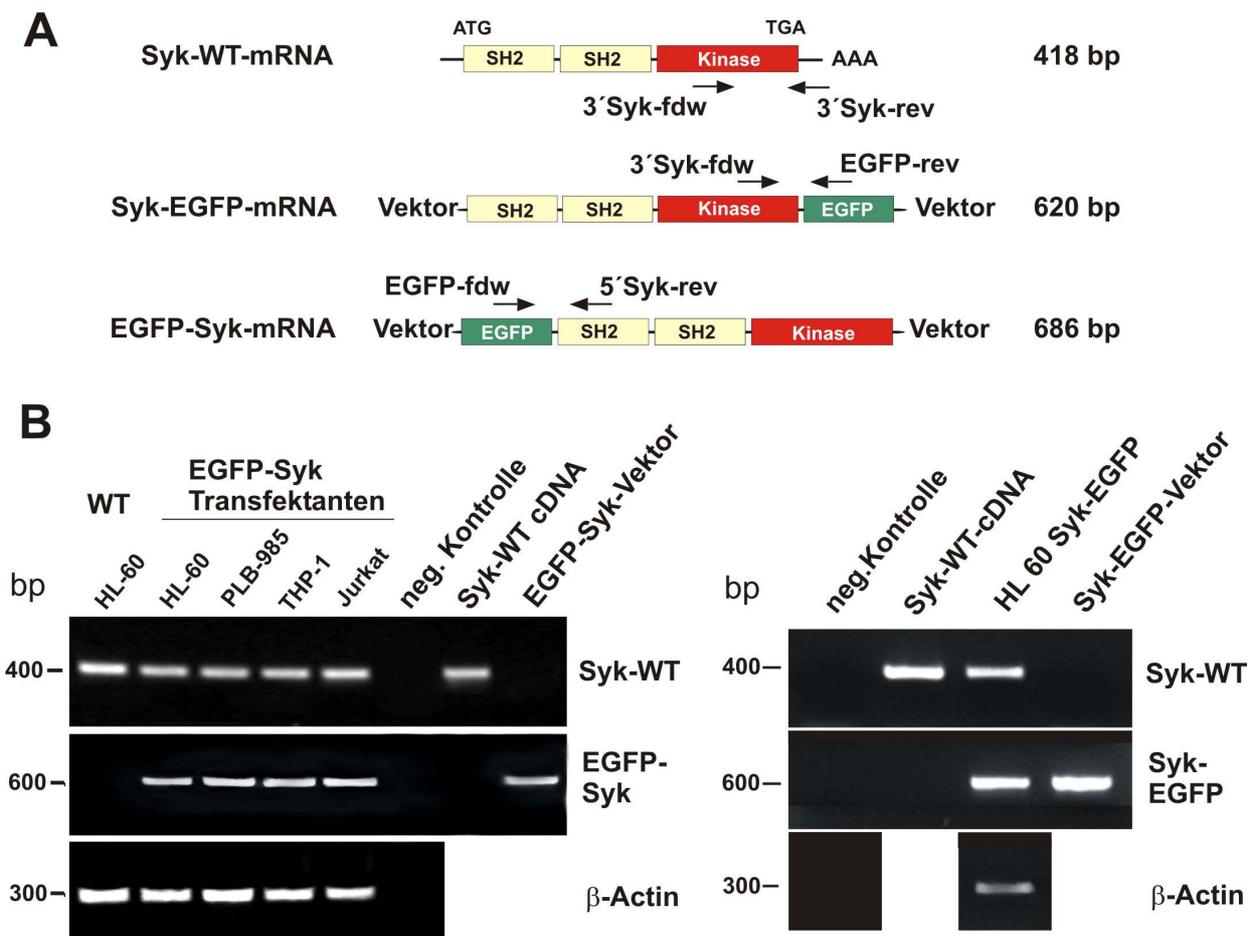


Abb. 9: Analyse der mRNA-Expression von hämatopoetischen Zelllinien (HL-60, Jurkat, PLB-985, THP-1), die transient mit Syk-EGFP und EGFP-Syk transfiziert wurden. **(A)** Schematische Darstellung der Syk-Wildtyp-, Syk-EGFP- und EGFP-Syk-cDNA, der *Primer* sowie Angabe der Größe der resultierenden PCR-Produkte. **(B)** Ethidiumbromid-gefärbtes 1%iges Agarosegel der RT-PCR-Produkte. Nachweis des Syk-Wildtyp-Fragments (418 bp), des EGFP-Syk- (686 bp) und des Syk-EGFP-Fragments (620 bp). Als Negativkontrolle wurde Wasser in der PCR-Reaktion eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden Syk-Wildtyp-cDNA und die Vektoren EGFP-Syk und Syk-EGFP verwendet. Die β -Aktin-PCR diente der Überprüfung der cDNA-Qualität.

Mit diesen *Primern* wurde jedoch kein Syk-Fragment aus dem Syk-EGFP- oder EGFP-Syk-Vektor amplifiziert (Abb. 9B), da der *Primer* 3'-Syk-rev so gewählt wurde, dass er an einen nach der Restriktion von Syk mit Eco RI und Kpn I und der Ligierung in den EGFP-Expresssionsvektor nicht mehr vorhandenen Abschnitt bindet. Dies begründet die Spezifität des RT-PCR-Protokolls für endogenes Syk.

Um die Syk-EGFP-Chimären zu detektieren, wurde ein weiteres RT-PCR-Protokoll unter Einsatz der Oligonukleotide 3'-Syk-fdw und EGFP-rev etabliert. Mit diesen *Primern* wurde ein 620 bp großes PCR-Produkt amplifiziert und so Syk-EGFP nachgewiesen (Abb. 9B). Aus Syk-Wildtyp-cDNA wurde kein Produkt erzeugt, da die Bindungsstelle des *Primers* 3'-Syk-fdw in der Kinasedomäne von Syk liegt, während der *Primer* EGFP-rev an EGFP bindet. Hierdurch wurde verhindert, dass durch dieses *Primer*-Paar endogene Wildtyp-Syk-Fragmente amplifiziert wurden. Die Expression der EGFP-Syk-mRNA wurde unter Verwendung der *Primer* 5'-Syk-rev und EGFP-fdw untersucht. Das PCR-Produkt mit 686 bp konnte in allen untersuchten Proben aus EGFP-Syk-transfizierten Zellen amplifiziert werden (Abb. 9B). Aus nicht-transfizierten HL-60-Wildtyp-Zellen und Syk-Wildtyp-cDNA wurde dieses PCR-Produkt nicht generiert, da die Bindungsstelle von 5'-Syk-rev in der SH2-Domäne von Syk liegt, während der *Primer* EGFP-fdw zu der EGFP-Region komplementär ist. Dadurch wurde gewährleistet, dass auch durch diese *Primer* keine endogenen Wildtyp-Syk-Fragmente amplifiziert wurden. Durch die RT-PCR-Analyse der verschiedenen Transfektanten konnte somit gezeigt werden, dass die Expressionsvektoren Syk-EGFP und EGFP-Syk auf mRNA-Ebene in den Transfektanten exprimiert wurden.

Analyse der Proteinexpression verschiedener Transfektanten

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob das chimäre EGFP-Syk-Protein in den verschiedenen transienten Transfektanten exprimiert wurde. Zur Proteinexpressionsanalyse wurden HL-60-Zellen mit dem EGFP-C1-Vektor, dem EGFP-Syk-Vektor und als Negativkontrolle mit der Plasmid-DNA allein elektroporiert. Aus den transfizierten Zellen wurden Proteine isoliert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Detektion mit einem polyklonalen Anti-GFP-Antikörper konnte in den EGFP-C1-transfizierten Zellen das EGFP mit einem Molekulargewicht von 30 kDa nachgewiesen werden (Abb. 10A). In den EGFP-Syk-Transfektanten konnte das

EGFP-Syk Protein mit einer Größe von 102 kDa nachgewiesen werden (Abb. 10A). Diese Größe stimmt mit der theoretisch errechenbaren Gesamtgröße des Fusionsproteins von 102 kDa, d.h. 72 kDa (Syk) plus 30 kDa (EGFP; Arun *et al.*, 2005), überein. Somit konnte nachgewiesen werden, dass das EGFP-Syk-Fusionskonstrukt auf Proteinebene exprimiert wurde und keine Bruchstücke des Chimärproteins entstanden.

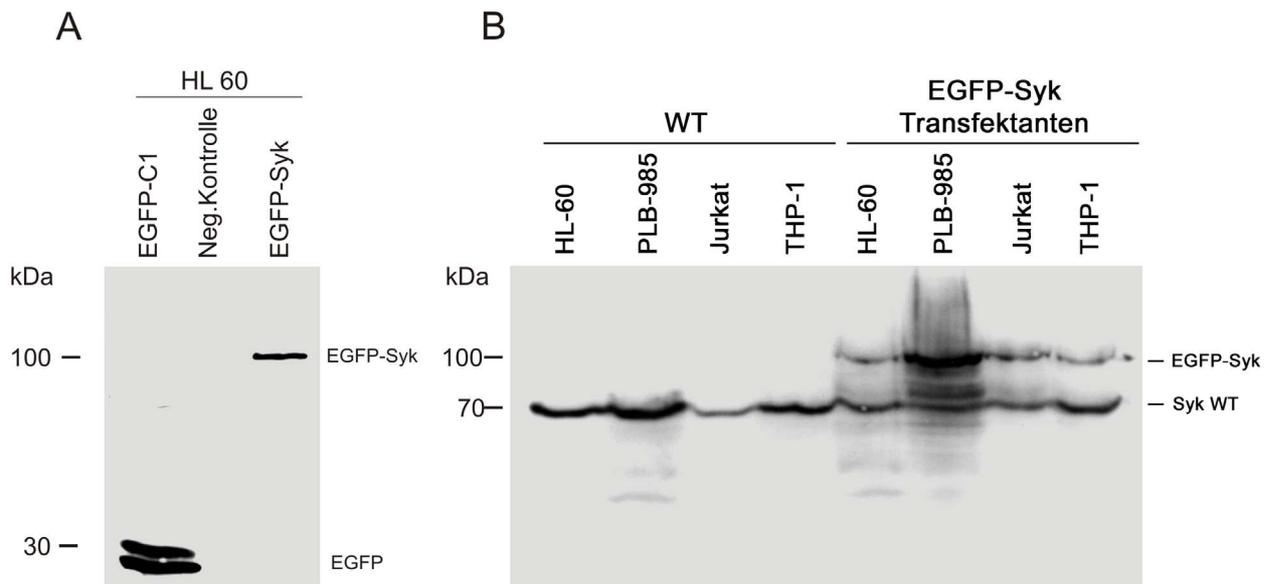


Abb. 10: Analyse der Proteinexpression nach transienter Transfektion von HL-60-, Jurkat-, PLB-985- und THP-1-Zellen. Die Zellen wurden durch Elektroporation mit EGFP-C1, EGFP-Syk oder dem Plasmid allein (Negativkontrolle) transfiziert und für die Westernblotanalyse verwendet. **(A)** Nachweis der Proteine EGFP (30 kDa) und EGFP-Syk (102 kDa) durch einen polyklonalen anti-GFP-Antikörper und ein sekundäres Peroxidasegekoppeltes anti-Kaninchen-IgG. **(B)** Nachweis von EGFP-Syk (102 kDa) in den transfizierten Zellen durch einen monoklonalen Antikörper gegen humanes Syk (Klon 4D10) und ein sekundäres anti-Maus-IgG. Nicht transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (WT). Das endogene Syk-Protein (Syk-WT) wurde sowohl in transfizierten als auch in nicht transfizierten Zellen bei 72 kDa detektiert.

Zusätzlich wurden verschiedene Zelllinien (HL-60, Jurkat, THP-1 und PLB-985) mit EGFP-Syk transfiziert und die Expression des EGFP-Syk-Chimärproteins anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Syk (Klon 4D10, IgG_{2a}) analysiert (Abb. 10B). Hier konnte in allen transfizierten Zelllinien EGFP-Syk mit einer Größe von 102 kDa detektiert werden. Durch den verwendeten Syk-Antikörper wurde auch endogenes Wildtyp-Syk mit 72 kDa sowohl in transfizierten, als auch in Wildtypzellen nachgewiesen. Kleinere proteolytische Fragmente von Syk, EGFP oder EGFP-Syk wurden nicht detektiert. In der Proteinanalyse der nicht

transfizierten Zellen fehlte erwartungsgemäß die 102 kDa-Bande des EGFP-Syk. Die biochemische Analyse der Transfektanten belegte somit die Proteinexpression durch die Vektoren EGFP-C1 und EGFP-Syk, wobei die Proteinanalyse keine Spaltproduktbildung von Syk oder EGFP ergab.

3.4. Funktionelle Charakterisierung der Transfektanten

Als nächster Schritt erfolgte die funktionelle Charakterisierung der EGFP-Syk- und EGFP-Syk Y323F-Transfektanten. In der vorliegenden Arbeit wurden für funktionelle Analysen vorwiegend differenzierte HL-60-Zellen (dHL-60-Zellen) verwendet, welche ein geeignetes Modell für die Analyse des Adhäsions- und Migrationsverhaltens von humanen neutrophilen Granulozyten darstellen (Hauert *et al.*, 2002).

Um zu untersuchen, ob die Funktionalität der EGFP-Syk-Transfektanten vergleichbar mit derjenigen von EGFP-Kontrollzellen war, wurden mit EGFP-C1 und EGFP-Syk transient transfizierte dHL-60-Zellen auf immobilisiertem Fibrinogen zur Adhäsion gebracht. Hierzu wurden die Adhäsion und Polarisierung der Zellen durch 100 nM N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) für 30 min bei 37°C stimuliert. Als Charakteristika der Zellfunktion wurden die Polarisierung und die Lamellipodienbildung mit einer Anreicherung von F-Aktin analysiert. Adhärente EGFP-Syk-Transfektanten zeigten wie die EGFP-Kontrollzellen zumeist einen bipolaren Phänotyp, der durch eine Anreicherung von F-Aktin im Lamellipodium gekennzeichnet war (Abb. 11, Pfeile). Im Gegensatz zu EGFP, welches in der polarisierten Zelle homogen verteilt blieb, wurde EGFP-Syk in das Lamellipodium umverteilt und kolokalisierte dort mit F-Aktin (Abb. 11, Pfeil). Eine Kolokalisation von Syk und F-Aktin in adhärenenten dHL-60-Wildtypzellen war von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt worden (Schymeinsky *et al.*, 2005). Die vorliegenden Daten zeigen somit, dass die EGFP-Syk-Transfektanten funktionell waren und in Bezug auf die Zellpolarisierung, Lamellipodienbildung und die Anreicherung von Syk und F-Aktin ähnliche Charakteristika zeigten wie nicht-transfizierte Wildtypzellen bzw. EGFP-C1-Kontrollzellen.

Die Syk-Mutante Y323F, der die Bindungsstelle für die PI3K fehlte, bildete ebenfalls Lamellipodien mit einer Anreicherung von F-Aktin und EGFP-Syk aus. Im Gegensatz zu den EGFP-C1- und EGFP-Syk-Kontrolltransfektanten bildeten die Syk-Mutanten jedoch gehäuft zwei, drei oder sogar multiple Lamellipodien (Abb. 11, Pfeilköpfe).

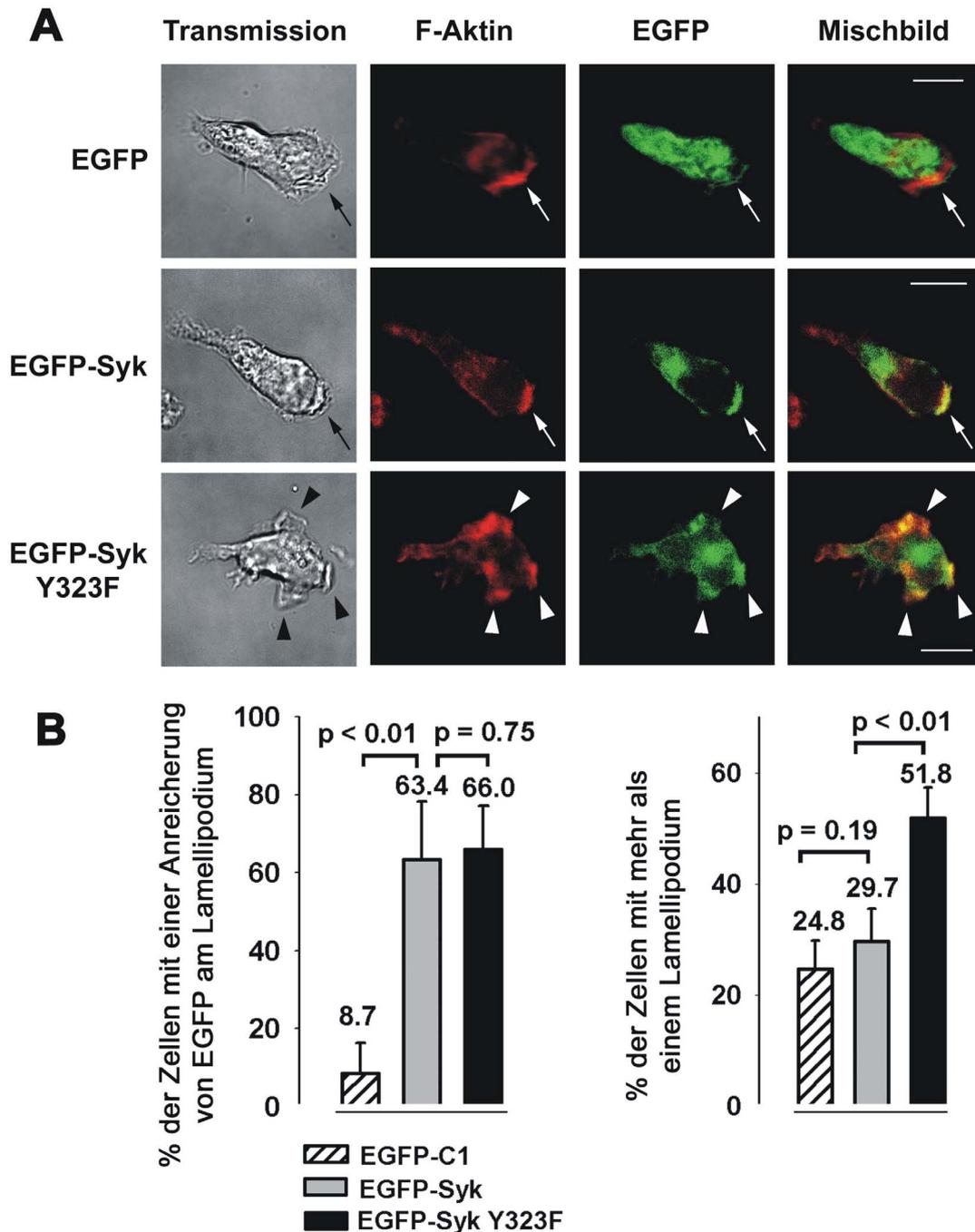


Abb. 11: Funktionelle Charakterisierung der Transfektanten. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von transient mit EGFP-C1, EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F transfizierten dHL-60-Zellen. Die Adhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen wurde durch 100 nM fMLP induziert. Die Lamellipodien der Zellen waren durch eine Anreicherung von F-Aktin charakterisiert. EGFP-C1-Transfektanten zeigten eine homogene Verteilung der Epifluoreszenz und bildeten zumeist ein einzelnes Lamellipodium (Pfeil). EGFP-Syk exprimierende Zellen zeigten vorwiegend ein Lamellipodium, das durch die Anreicherung von EGFP-Syk gekennzeichnet war (Pfeil). Dagegen bildeten EGFP-Syk Y323F-Transfektanten gehäuft multiple Lamellipodien (Pfeilköpfe). Diese waren ebenfalls durch eine Anreicherung von EGFP-Syk charakterisiert; Marker = 10 μ m. **(B)** Quantitative Analyse der Umverteilung von EGFP, EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F und der Zahl der Lamellipodien in den verschiedenen Transfektanten. Polarisierte dHL-60-Zellen, die Syk im Lamellipodium anreicherten (links) bzw. mehr als einem Lamellipodium aufwiesen (rechts), wurden unter dem Mikroskop gezählt; n = 167 (EGFP-C1), n = 343 (EGFP-Syk-Wildtyp), n = 562 (EGFP-Syk Y323F). Die gezählten Zellen stammten aus sechs unabhängigen Experimenten.

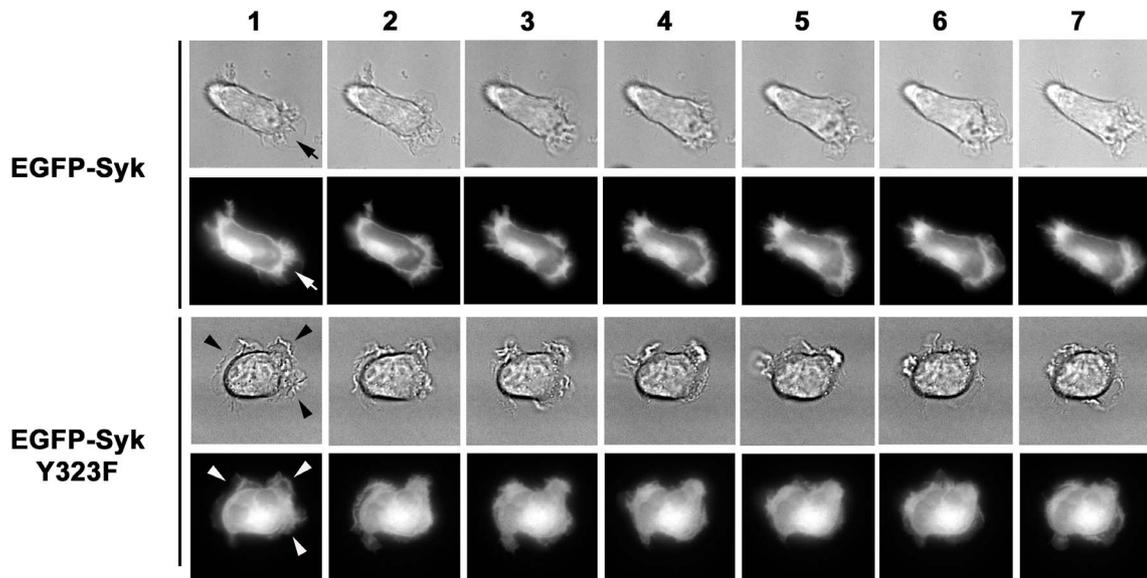
Die quantitative Auswertung (Abb. 11B) zeigte lediglich bei 8,7% der EGFP-Kontrollzellen eine Anreicherung der Fluoreszenz im Lamellipodium, während dieser Anteil bei den EGFP-Syk-Transfektanten signifikant erhöht war (63,4%). Dies zeigte, dass der Effekt der angereicherten Fluoreszenz spezifisch für EGFP-Syk war. Die EGFP-Syk Y323F-Transfektanten wiesen mit einer Umverteilung von 66,0% des EGFP-Syk in die Lamellipodien keinen signifikanten Unterschied zu den EGFP-Syk-Zellen auf, was zeigte, dass die Syk-Mutation keinen Einfluss auf die Syk-Umverteilung in das Lamellipodium hatte. Bei den EGFP-Kontrollzellen bildeten lediglich 24,8% mehr als ein Lamellipodium aus. Die EGFP-Syk-Transfektanten unterschieden sich hiervon nicht signifikant: Ein Anteil von 29,7% der Zellen wiesen mehr als ein Lamellipodium auf. Die Syk-Mutation Y323F jedoch erhöhte den Anteil der Zellen mit multiplen Lamellipodien signifikant auf 51,8%. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Tyr³²³ in der Linkerregion von Syk eine Rolle bei der Regulierung der Lamellipodienzahl spielt.

3.5. Zeitliche Instabilität der Lamellipodien EGFP-Syk Y323F exprimierender dHL-60-Zellen

In weiterführenden Untersuchungen wurde die Dynamik des Polarisationsverhaltens von EGFP-Syk- und EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen als eine Funktion von Stimulus und Zeit mittels Zeitraffer-Videomikroskopie untersucht. Dabei wurde die Fähigkeit von dHL-60-Zellen, sich nach Stimulation auch ohne Gradient zu polarisieren (Van Haastert und Devreotes, 2004), genutzt. Nach Stimulation der Zellen mit 100 nM fMLP auf immobilisiertem Fibrinogen wurden videomikroskopische Aufnahmen in Intervallen von 30 sec angefertigt. Die Zellen wurden mit Zeitrafferaufnahmen bezüglich der Zahl und Stabilität ihrer Lamellipodien analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass EGFP-Syk-Kontrollzellen nach der Stimulation einen Gestaltwandel vollzogen und vorwiegend einen bipolaren Phänotyp ausbildeten, der durch eine Anreicherung von Syk im Lamellipodium charakterisiert war und über den beobachteten Zeitraum von mindestens 3 min stabil blieb (Abb. 12A, Pfeil). Dagegen führte die Expression von EGFP-Syk Y323F in dHL-60-Zellen zur Bildung von multiplen instabilen Lamellipodien (Abb. 12A, Pfeilköpfe). Die quantitative Analyse (Abb. 12B) ergab, dass lediglich 26,3% der EGFP-Syk-Transfektanten während des untersuchten Zeitraumes von mindestens 3 min multiple Lamellipodien ausbildeten. Dieser Anteil war bei den EGFP-Syk Y323F-Transfektanten signifikant erhöht

(57,0%). Die verminderte Fähigkeit der EGFP-Syk Y323F-Mutanten, eine eindeutige Polarisierung auszubilden, ging also mit einer verringerten zeitlichen Stabilität der vermehrt gebildeten Lamellipodien einher.

A



B

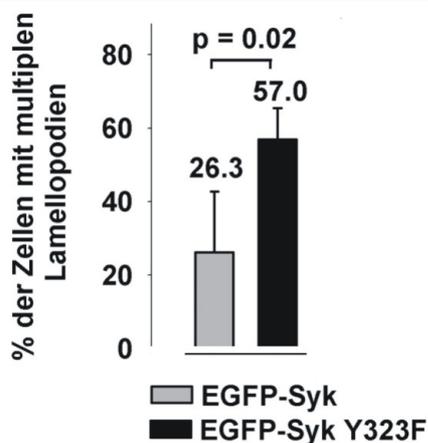


Abb. 12: Zeitliche und räumliche Instabilität der Lamellipodien der Syk-Mutante Y323F. (A) Videomikroskopische Zeitraffer-Aufnahmen von transient mit EGFP-Syk- oder EGFP-Syk Y323F transfizierten dHL-60-Zellen. Die Aufnahmen wurden in Intervallen von 30 sec angefertigt. Das Lamellipodium der EGFP-Syk-Transfektante blieb über den beobachteten Zeitraum stabil (Pfeil). Im Gegensatz dazu bildete die EGFP-Syk Y323F-transfizierte Zelle multiple Lamellipodien aus (Pfeilköpfe); Marker = 10 μ m. (B) Quantitative Analyse der Lamellipodienbildung. Polarisierte Zellen mit multiplen Lamellipodien im beobachteten Zeitraum von mindestens 3 min nach Stimulation mit 100 nM fMLP wurden gezählt; n = 57 (EGFP-Syk-Wildtyp), n = 59 (EGFP-Syk Y323F). Gezählte Zellen stammten aus vier unabhängigen Experimenten.

3.6. Migrationsdefekt EGFP-Syk Y232F exprimierender dHL-60-Zellen

Da die Etablierung einer geordneten Zellpolarität mit jeweils einem Lamellipodium und einem Uropod als eine Voraussetzung für die Chemotaxis angesehen wird (Van Haastert und Devreotes, 2004), wurde das Migrationsverhalten der verschiedenen Transfektanten untersucht. EGFP, EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F exprimierende

Zellen wurden hierzu einem chemotaktischen Gradienten von 10 nM fMLP ausgesetzt und anschließend mittels Zeitraffer-Videomikroskopie, bei der alle 60 sec eine Aufnahme angefertigt wurde, analysiert. Die EGFP und EGFP-Syk exprimierenden Kontrollzellen zeigten einen typischen migratorischen Phänotyp mit einem Lamellipodium am anterioren Zellpol (Abb. 13A, Pfeile). Das Lamellipodium der EGFP-Syk-Transfektante war durch eine Anreicherung von EGFP-Syk gekennzeichnet, während EGFP homogen über den Zellkörper verteilt blieb. Die Fähigkeit von dHL-60-Zellen, in einem chemotaktischen Gradienten zu migrieren, wurde durch die Expression von EGFP-Syk Y323F wesentlich eingeschränkt. Wie bereits bei der Adhäsion ohne Gradient zeigten die Mutanten auch im Gradienten vermehrt multiple instabile Lamellipodien. Die Anreicherung von EGFP-Syk Y323F im Lamellipodium war im Vergleich zu den EGFP-Syk-Kontrollzellen nicht gestört (Abb. 13A, Pfeilköpfe). Die Umrisse der Zellen (Abb. 13B) sollen den polarisierten migratorischen Phänotyp der EGFP-C1- und EGFP-Syk-Transfektanten im Vergleich zu der instabilen Polarisierung der Syk-Mutante Y323F verdeutlichen. Für die quantitative Analyse (Abb. 13C) wurden Zellen als migrierend gewertet, deren Uropod sich innerhalb des beobachteten Zeitraums von mindestens 3 min erkennbar fortbewegte. Die Auswertung ergab, dass 72,2% der EGFP-C1-Transfektanten und 71,8% der EGFP-Syk exprimierenden Zellen im chemotaktischen Gradienten von 10 nM fMLP migrierten, was keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen Transfektanten bedeutete. Der Anteil migrierender Zellen war bei den Syk-Mutanten dagegen mit 34,0% signifikant vermindert. Dies zeigt, dass die Mutation von Syk-Tyr³²³ nicht nur die Fähigkeit der Zelle, einen stabilen bipolaren Phänotyp auszubilden, sondern auch die Migration beeinträchtigte. Hierbei blieb die Umverteilung von Syk in die Lamellipodien unbeeinflusst.

3.7. Syk-Tyr³²³ spielt eine Rolle bei der Umverteilung der PI3K-Untereinheit p110δ in das Lamellipodium

In weiterführenden Untersuchungen wurde der molekulare Signalweg *downstream* von Syk, der für die Stabilisierung der Zellpolarität und somit für eine effektive Migration verantwortlich ist, näher charakterisiert. Hierzu wurde die subzelluläre Verteilung der katalytischen PI3K-Untereinheit p110δ in EGFP-Syk- und EGFP-Syk Y323F-Transfektanten fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

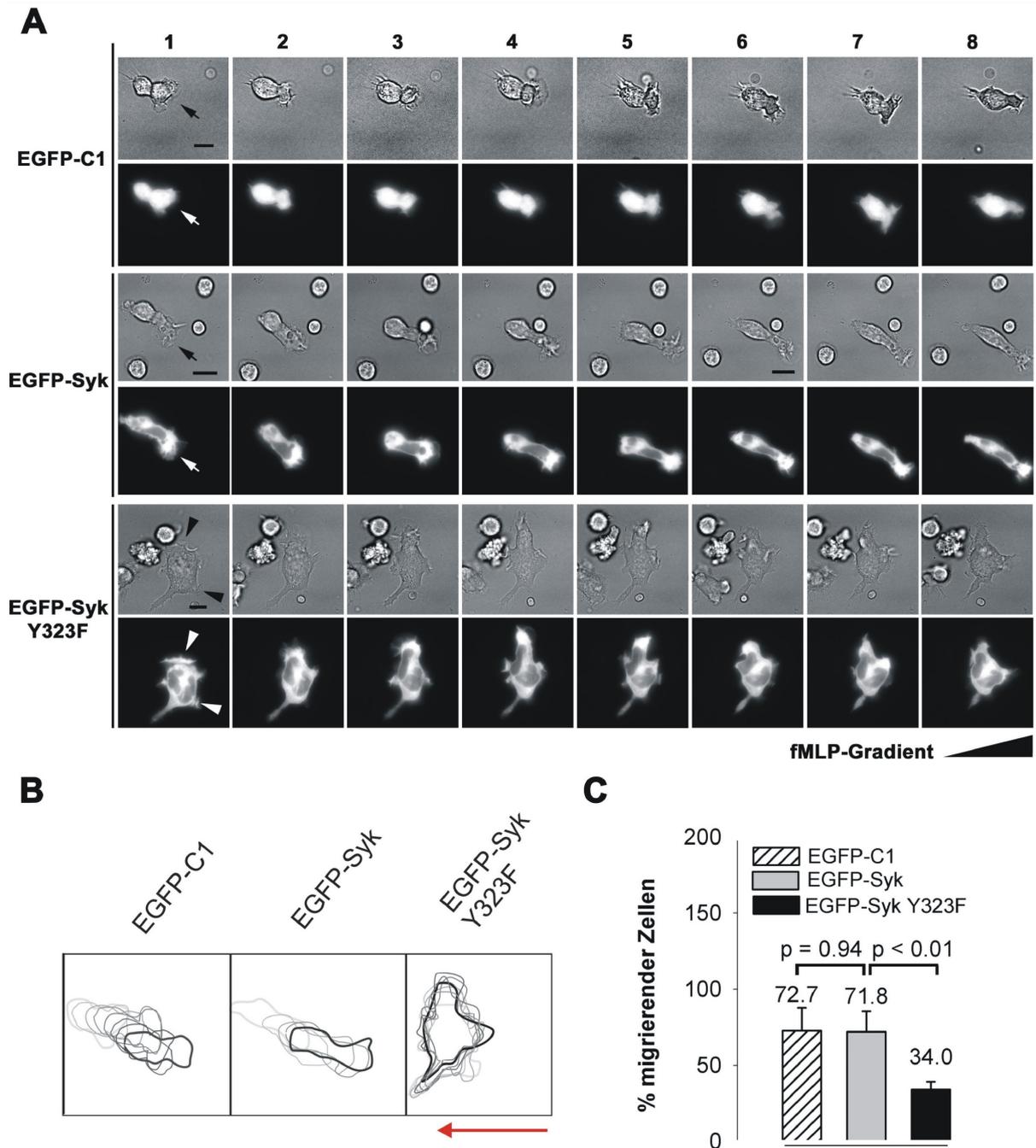


Abb. 13: Tyr³²³ von Syk spielt eine Rolle bei der Migration von dHL-60-Zellen durch Stabilisierung des bipolaren Phänotyp. (A) Zeitraffer-Videomikroskopieaufnahmen von transient mit EGFP-C1, EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F transfizierten dHL-60-Zellen. Die Migration wurde durch einen Gradienten von 10 nM fMLP auf immobilisiertem Fibrinogen induziert. Die Intervalle zwischen den Aufnahmen betragen 60 sec. Die EGFP-C1-Transfektante zeigte ein stabiles Lamellipodium (Pfeil). EGFP blieb homogen in der Zelle verteilt. Dagegen war EGFP-Syk während des beobachteten Zeitraums am vorderen Ende der migrierenden Zelle angereichert. Die Zelle bildete ebenfalls ein stabiles Lamellipodium (Pfeil). Im Gegensatz dazu zeigte die EGFP-Syk Y323F-Transfektante multiple instabile Lamellipodien (Pfeilköpfe), die durch eine Anreicherung von EGFP-Syk Y323F gekennzeichnet waren. Der Multi-Lamellipodien-Phänotyp war assoziiert mit einer Einschränkung der Migration; Marker = 10 μ m. (B) Umrisse der Zellen. (C) Quantitative Analyse migrierender dHL-60-Zellen. Zellen wurden als migrierend angesehen, wenn sich der Uropod im beobachteten Zeitraum von mindestens 3 min erkennbar fortbewegte; n = 30 (EGFP-C1), n = 78 (EGFP-Syk-Wildtyp), n = 86 (EGFP-Syk Y323F). Die untersuchten Zellen stammten aus vier unabhängigen Experimenten.

Diese Untereinheit wurde für die Untersuchung gewählt, weil bereits bekannt war, dass die regulatorische PI3K-Untereinheit p85, die mit der katalytischen Untereinheit p110 δ ein funktionelles Heterodimer bildet, an Syk-Tyr³²³ bindet (Moon *et al.*, 2005). Außerdem konnte bereits eine funktionelle Rolle von p110 δ bei der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten gezeigt werden (Sadhu *et al.*, 2003). Somit sollte der Frage nachgegangen werden, ob Syk eine Rolle bei der zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Verteilung und Regulation der PI3K δ -Aktivität spielt. Um die subzelluläre Verteilung der PI3K-Untereinheit p110 δ zu untersuchen, wurden auf immobilisiertem Fibrinogen adhärenente und polarisierte dHL-60-Zellen, die EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F exprimierten, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers untersucht. Es zeigte sich, dass polarisierte EGFP-Syk-Kontrollzellen p110 δ im Lamellipodium anreicherten. Die PI3K-Untereinheit p110 δ kolokalisierte an der Zellfront mit der EGFP-Syk-Epifluoreszenz (Abb. 14A, Pfeil). Dagegen war die Umverteilung von p110 δ in die Lamellipodien bei den Syk-Mutanten gestört (Abb. 14A, Pfeilköpfe).

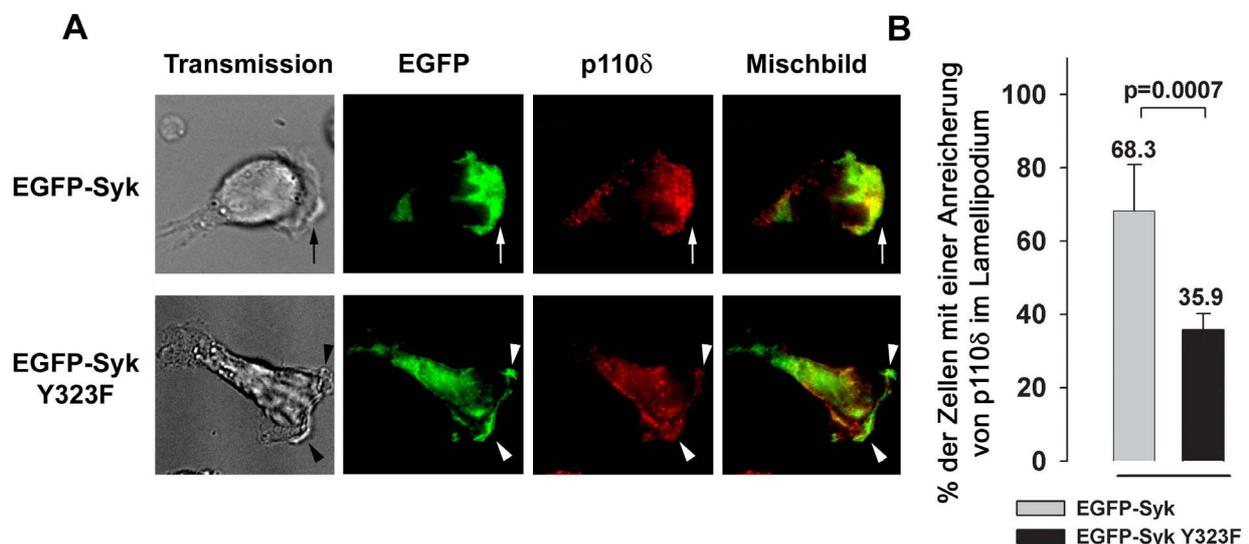


Abb. 14: Verminderte Anreicherung von PI3K p110 δ in den Lamellipodien der Syk-Mutanten. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von transient mit EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F transfizierten dHL-60-Zellen. In EGFP-Syk-Transfektanten wurden sowohl EGFP-Syk als auch p110 δ im Lamellipodium angereichert und kolokalisierten dort (Pfeil). Im Gegensatz dazu war die Anreicherung von p110 δ in den Lamellipodien der EGFP-Syk Y323F-Transfektanten gestört (Pfeilköpfe). Marker = 10 μ m. (B) Quantitative Analyse der Anreicherung von p110 δ im Lamellipodium polarisierter Zellen. Polarisierter dHL-60-Zellen, die p110 δ im Lamellipodium anreicherten wurden unter dem Mikroskop gezählt. n = 73 (EGFP-Syk), n = 66 (EGFP-Syk Y323F). Die gezählten Zellen stammten aus vier unabhängigen Experimenten.

Die quantitative Analyse (Abb. 14B) ergab, dass 68,3% der EGFP-Syk-Transfektanten p110 δ im Lamellipodium anreicherten, während dieser Anteil in den EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen signifikant auf 35,9% vermindert war. Dies weist auf eine Rolle des Syk-Tyr³²³ bei der Anreicherung der PI3K-Untereinheit p110 δ im Lamellipodium polarisierter Zellen hin.

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 in den EGFP-Syk- und EGFP-Syk Y323F-Transfektanten ergab aufgrund einer unzureichenden Bindung des Antikörpers gegen die p85 α -Untereinheit der PI3K keine reproduzierbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3.8. Bildung multipler Lamellipodien und verminderte Anreicherung der PI3K-Untereinheit p110 δ in dHL-60 Syk-siRNA-Zellen

Um zu bestätigen, dass Syk für die Umverteilung der PI3K-Untereinheit p110 δ essentiell ist, wurde ein HL-60-Zellklon verwendet, der nach retroviralem Gentransfer stabil siRNA gegen Syk exprimiert und somit eine stark verringerte Syk-Expression aufweist (Schymeinsky *et al.*, 2006). Die siRNA-dHL-60-Zellen und die dHL-60-WT-Zellen wurden mit 100 nM fMLP auf immobilisiertem Fibrinogen zur Adhäsion gebracht. Die funktionelle Untersuchung der polarisierten Zellen zeigte, dass die *Down*-Regulation von Syk im Syk-siRNA-Zellklon mit der Zellpolarisierung interferierte und zur Bildung multipler Lamellipodien nach Stimulation mit fMLP führte (Abb. 15A, Pfeilköpfe), während die Syk-WT-Zellen bevorzugt einen bipolaren Phänotyp mit einem Lamellipodium ausbildeten. Die immunhistochemische Analyse ergab, dass die PI3K-Untereinheit p110 δ im Lamellipodium der Syk-WT-Zellen angereichert wurde (Abb. 15A, Pfeil). Im Gegensatz dazu zeigten die Syk-siRNA-Zellen eine gestörte Anreicherung von p110 δ in den multiplen Lamellipodien (Abb. 15A, Pfeilköpfe). Die quantitative Auswertung (Abb. 15B) ergab, dass lediglich 33,0% der dHL-60-WT-Zellen mehr als ein Lamellipodium aufwiesen, während dieser Anteil bei den Syk-siRNA-Zellen signifikant erhöht war (51,0%). Die dHL-60-WT-Zellen verteilten in 63,0% der Fälle die PI3K-Untereinheit p110 δ in das Lamellipodium um. Jedoch reicherten lediglich 37,0% der adhärennten Syk-siRNA-Zellen p110 δ an der Zellfront an, was eine signifikante Verminderung bedeutete. Diese Daten bestätigen die Rolle von Syk für die Umverteilung der PI3K p110 δ in das Lamellipodium polarisierter Zellen.

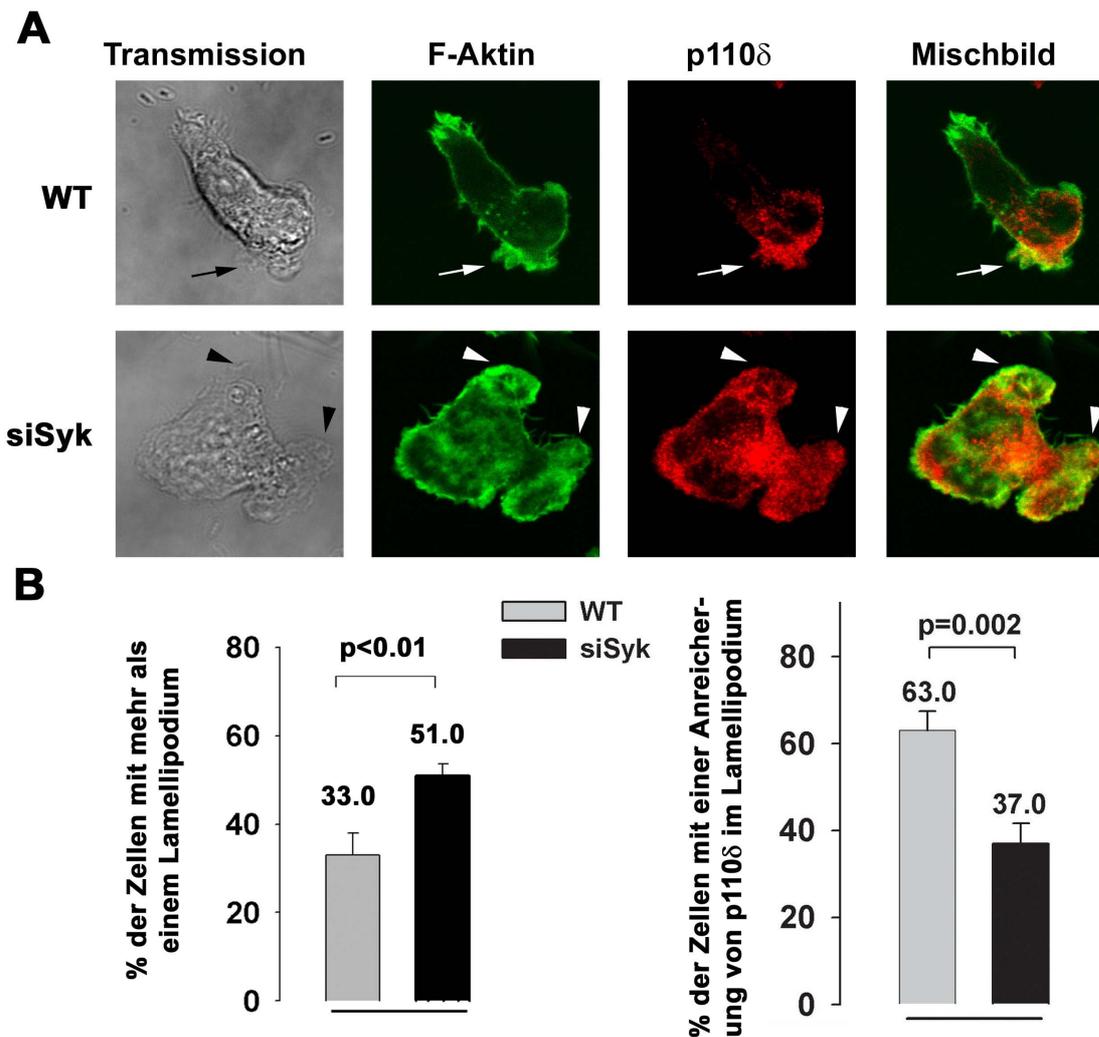


Abb. 15: Bildung multipler Lamellipodien und verminderte Umverteilung der PI3K-Untereinheit p110 δ in dHL-60 Syk-siRNA-Zellen. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von polarisierten dHL-60-WT- und dHL-60-Syk-siRNA-Zellen. Die Adhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen wurde mit 100 nM fMLP induziert. Die dHL-60-WT-Zellen bildeten vorzugsweise ein Lamellipodium aus, in dem sie p110 δ anreicherten (Pfeil). Im Gegensatz dazu zeigten dHL-60-Syk-siRNA-Zellen multiple Lamellipodien (Pfeilköpfe) und eine gestörte Umverteilung von p110 δ . **(B)** Quantitative Analyse der Lamellipodienbildung und der Anreicherung von p110 δ im Lamellipodium. Polarisierte dHL-60-WT-Zellen (n = 264) und dHL-60-Syk-siRNA-Zellen (n = 296), die mehr als ein Lamellipodium bildeten (links), und Zellen, die p110 δ im Lamellipodium anreicherten (rechts; n = 131 (dHL-60-WT/ p110 δ), n = 196 (dHL-60-Syk-siRNA/ p110 δ)) wurden unter dem Mikroskop gezählt. Die gezählten Zellen stammten aus drei unabhängigen Experimenten.

3.9. Verminderte Anreicherung von PI3K-Produkten im Lamellipodium von dHL-60-PHAkt-GFP-Zellen nach pharmakologischer Hemmung von Syk

Mit Hilfe von PHAkt-GFP-Zellen wurde untersucht, welche Auswirkungen die gestörte PI3K δ -Umverteilung auf die Akkumulierung von PI3K-Produkten im Lamellipodium polarisierter dHL-60-Zellen hatte.

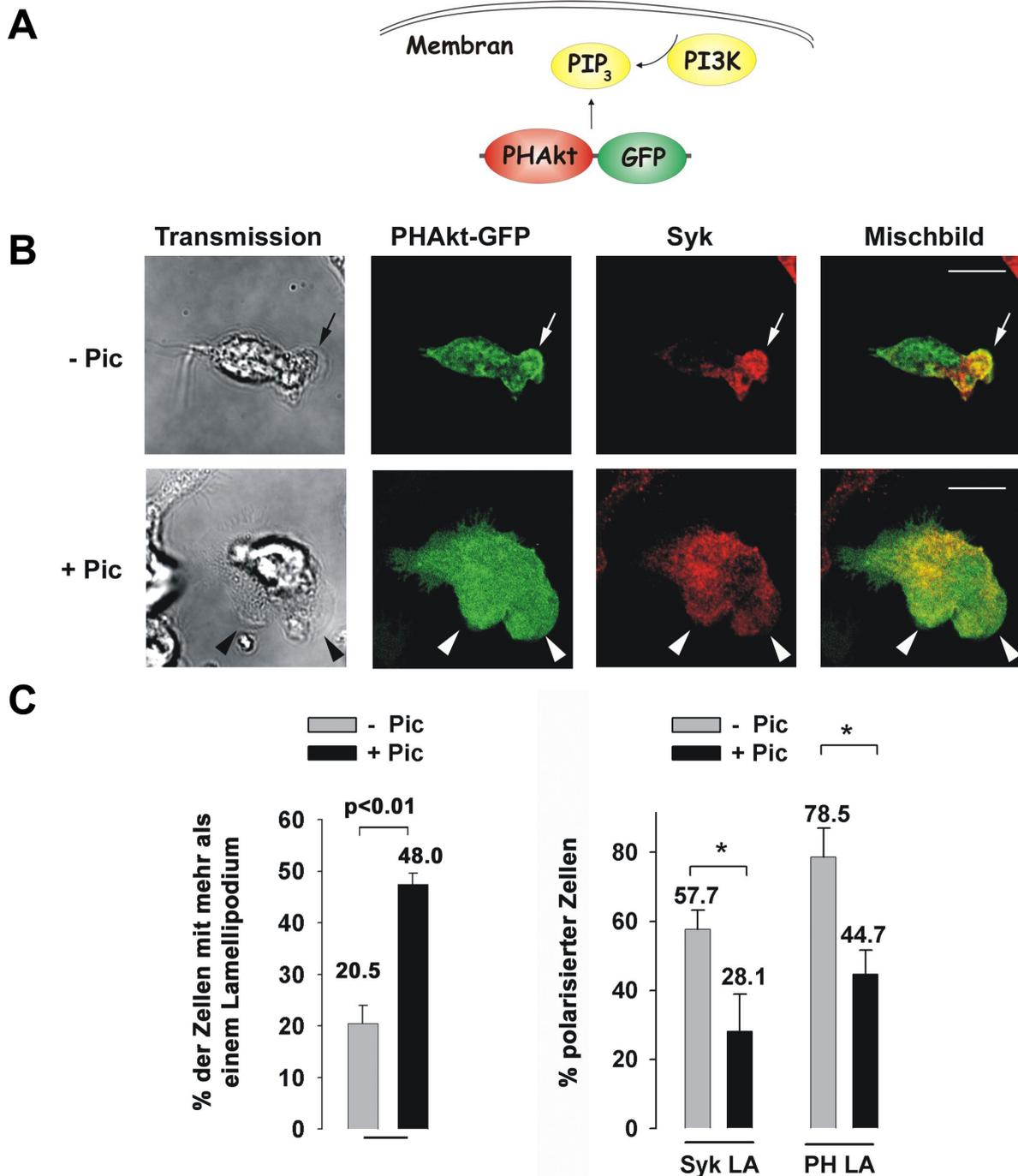


Abb. 16: Umverteilung von PHAkt-GFP und Syk in dHL-60-PHAkt-GFP-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Rekrutierung von PHAkt-GFP an die vordere Zellmembran. **(B)** Mikroskopische Aufnahmen von polarisierten dHL-60-PHAkt-GFP-Zellen. Die Adhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen wurde mit 100 nM fMLP induziert. In den Vehikel-inkubierten Kontrollzellen wurden PHAkt-GFP und Syk im Lamellipodium von polarisierten Zellen angereichert (Pfeil). Pharmakologische Hemmung von Syk mit Piceatannol führte zu einer homogenen Verteilung von Syk und verminderter Anreicherung von PHAkt-GFP in den Lamellipodien (Pfeilköpfe); Marker = 10 μ m. **(C)** Quantitative Analyse der Lamellipodienbildung (links) und der Anreicherung von Syk (Syk LA) und PHAkt-GFP (PH LA) im Lamellipodium polarisierter dHL-60-PHAkt-GFP-Zellen (rechts). Polarisierte Zellen, die mehr als ein Lamellipodium bildeten (links) und Zellen, die Syk und PHAkt-GFP im Lamellipodium anreicherten (rechts), wurden gezählt; n = 137 (Kontrollzellen), n = 157 (Piceatannol-inkubierte Zellen). Die gezählten Zellen stammten aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei den PHAkt-GFP-Zellen handelt es sich um eine stabile Zelllinie, die die Pleckstrin-homologe Region der Akt-Kinase - gekoppelt an GFP - exprimiert, und somit einen fluoreszierenden Marker für 3-Phosphoinositide als Biosensoren für die PI3K-Aktivität besitzt (Servant *et al.*, 2000). Die Umverteilung von PHAkt-GFP stellt somit einen indirekten Nachweis für die PI3K-Aktivität dar (Abb. 16A). PHAkt-GFP-dHL-60-Zellen wurden durch Stimulation mit fMLP (100 nM) auf immobilisiertem Fibrinogen zur Adhäsion gebracht. Syk wurde vor der Adhäsion durch 30-minütige Inkubation mit 30 μ M des spezifischen Syk-Inhibitors Piceatannol pharmakologisch gehemmt. Da Piceatannol in DMSO gelöst war, wurden die Kontrollzellen unter denselben Bedingungen mit dem Vehikel (DMSO) behandelt. Die Mehrzahl der Kontrollzellen bildete einen bipolaren Phänotyp aus, der durch die Anreicherung von PHAkt-GFP im Lamellipodium gekennzeichnet war (Abb. 16B, Pfeil). Syk kolokalisierte bei einem Großteil dieser Zellen mit PHAkt-GFP am vorderen Zellende. Im Gegensatz dazu bildeten die Zellen nach der Behandlung mit Piceatannol multiple Lamellipodien (Abb. 16B, Pfeilköpfe). Diese Zellen waren außerdem vermindert in der Lage, Syk und PHAkt-GFP in den Lamellipodien anzureichern. Die quantitative Analyse (Abb. 16C) zeigte lediglich bei 20,5% der Kontrollzellen mehr als ein Lamellipodium, während dieser Anteil bei den Piceatannol-behandelten Zellen signifikant erhöht war (48,0%). Außerdem zeigte sich, dass 57,7% der Kontrollzellen Syk in das Lamellipodium umverteilten, ein signifikant höherer Anteil als bei den Piceatannol-behandelten Zellen (28,1%). Auch die Anreicherung von PHAkt-GFP im Lamellopodium war bei den Kontrollzellen signifikant höher (78,5% der Zellen) als bei den Piceatannol-inkubierten Zellen (44,7% der Zellen). Diese Daten deuten auf eine Rolle von Syk für die lokale PI3K-Aktivierung am vorderen Zellpol hin.

3.10. Umverteilung von Cbl und Vav in das Lamellipodium von EGFP-Syk- und EGFP-Syk Y323F-Transfektanten

Da bekannt ist, dass die Ubiquitinligase Cbl ebenfalls an Syk-Tyr³²³ bindet und dessen Aktivität negativ regulieren kann (Lupher *et al.*, 1998), wurde die subzelluläre Cbl-Verteilung in EGFP-Syk Y323F-Transfektanten im Vergleich zu EGFP-Syk-Kontrollzellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Großteil der EGFP-Syk-Kontrollzellen reicherte nach Induktion der Polarisierung mit fMLP (100 nM) auf immobilisiertem Fibrinogen Cbl im Lamellipodium an und zeigte dort eine Kolokalisation von Cbl mit EGFP-Syk (Abb. 17A, Pfeil). Bei den EGFP-Syk Y323F-

Transfektanten war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten (Abb. 17A, Pfeilköpfe). Die quantitative Analyse (Abb. 17B) ergab keinen signifikanten Unterschied in der Umverteilung von Cbl in den Syk-Mutanten (64,0% der Zellen) im Vergleich zu den EGFP-Syk-Transfektanten (66,0% der Zellen). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der verminderten Umverteilung von p110 δ in das Lamellipodium polarisierter Zellen um einen für die PI3K p110 δ spezifischen Effekt handelt.

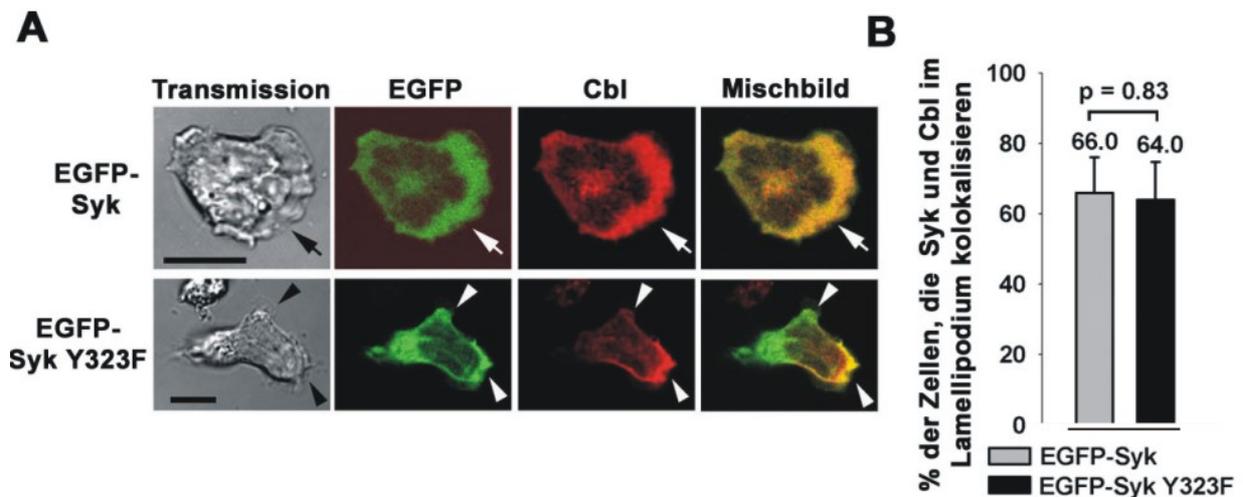


Abb. 17: Cbl kolokalisierte mit EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F im Lamellipodium. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von transient mit EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F transfizierten, adhärennten dHL-60-Zellen. In den EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen wurden wie in den EGFP-Syk-Transfektanten sowohl Syk als auch Cbl in den Lamellipodien angereichert (Pfeil, Pfeilköpfe); Marker = 10 μ m. **(B)** Quantitative Analyse der Kolokalisation von Cbl mit EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F im Lamellipodium polarisierter Zellen. Polarisierter dHL-60-Zellen, die EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F mit Cbl im Lamellipodium kolokalisierten, wurden unter dem Mikroskop gezählt; n = 75 (EGFP-Syk), n = 96 (EGFP-Syk Y323F). Die gezählten Zellen stammten aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie bereits bekannt kolokalisiert Vav mit Syk und EGFP-Syk im Lamellipodium polarisierter dHL-60-Zellen (Schymeinsky *et al.*, 2006). Weiterhin wurde gezeigt, dass Vav eine Plekstrin-homologe Region (PH-Domäne) besitzt und über diese durch die PI3K rekrutiert werden kann (Prisco *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob die Rekrutierung von Vav durch die Mutation von Syk-Tyr³²³ gestört war, wurde dessen Lokalisation in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch in polarisierten EGFP-Syk-Transfektanten und EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen untersucht. Die konfokale Mikroskopie zeigte, dass Vav sowohl bei EGFP-Syk- als auch bei EGFP-Syk Y323F-Transfektanten in den Lamellipodien angereichert wurde und dort mit EGFP-Syk kolokalisierte (Abb. 18A, Pfeil; Pfeilköpfe).

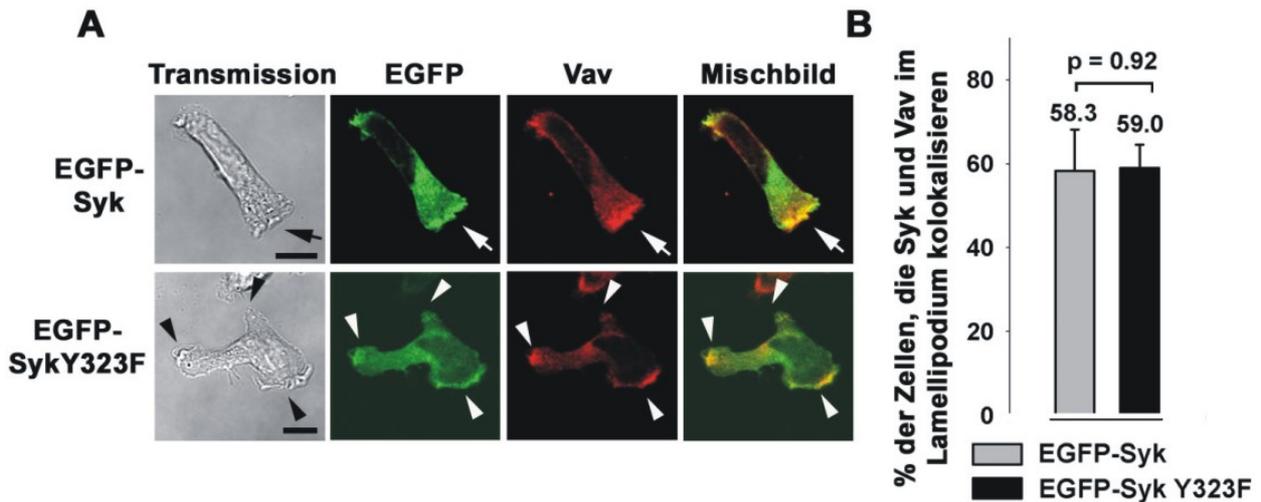


Abb. 18: Vav kolokalisierte mit EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F im Lamellipodium. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von transient mit EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F transfizierten polarisierten dHL-60-Zellen. In EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen wurden wie in EGFP-Syk-Transfektanten sowohl Syk als auch Vav in den Lamellipodien angereichert (Pfeil, Pfeilköpfe); Marker = 10 μ m. **(B)** Quantitative Analyse der Kolokalisation von Vav mit EGFP-Syk und EGFP-Syk Y323F in den Lamellipodien polarisierter Zellen. Polarisierte dHL-60-Zellen, die EGFP-Syk oder EGFP-Syk Y323F im Lamellipodium anreicherten und dort mit Vav kolokalisierten, wurden unter dem Mikroskop gezählt; n = 55 (EGFP-Syk), n = 70 (EGFP-Syk Y323F). Gezählte Zellen wurden aus drei unabhängigen Experimenten genommen.

Die quantitative Auswertung zeigte in 58,3% der EGFP-Syk exprimierenden Zellen eine Kolokalisation von EGFP-Syk mit Vav im Lamellipodium. Für die EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen ergab sich mit einer Kolokalisation in 59,0% der Zellen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Tyr³²³ von Syk keine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Vav an das vordere Zellende spielt und die PI3K-Bindungsstelle von Syk eine von Vav unabhängige Bedeutung bei der Zellpolarisation besitzt.

3.11. Defekte Polarisierung von Syk-defizienten murinen neutrophilen Granulozyten

Differenzierte HL-60-Zellen stellen ein valides Modellsystem für humane neutrophile Granulozyten dar (Hauert *et al.*, 2002). Jedoch kann auch das beste Modellsystem Verhaltensabweichungen gegenüber primären Zellen aufweisen. Deshalb wurde die Relevanz der mit den dHL-60-Zellen durchgeführten Untersuchungen für primäre neutrophile Granulozyten durch die Verwendung von murinen Syk^{+/-} und Syk^{-/-} neutrophilen Granulozyten aus Knochenmarks-chimären Mäusen verifiziert. Die

Adhäsion der murinen $\text{Syk}^{+/-}$ - und $\text{Syk}^{-/-}$ - PMN wurde durch Stimulierung mit 10 μM fMLP auf immobilisiertem Fibrinogen für 30 min bei 37°C induziert. Die Polarisierung der adhärennten Zellen wurde unter dem konfokalen Mikroskop analysiert. Stimulierte murine $\text{Syk}^{+/-}$ - PMN bildeten bevorzugt einen bipolaren Phänotyp aus und verteilten Syk an das vordere Zellende um, wo es im Lamellipodium mit F-Aktin kolokalisierte (Abb. 19, Pfeil). Im Gegensatz dazu bildeten $\text{Syk}^{-/-}$ -PMN multiple Lamellipodienbildung aus (Abb. 19, Pfeilköpfe). Dieses Ergebnis weist auf eine funktionelle Rolle von Syk bei der Stabilisierung der Zellpolarität auch in primären neutrophilen Granulozyten hin.

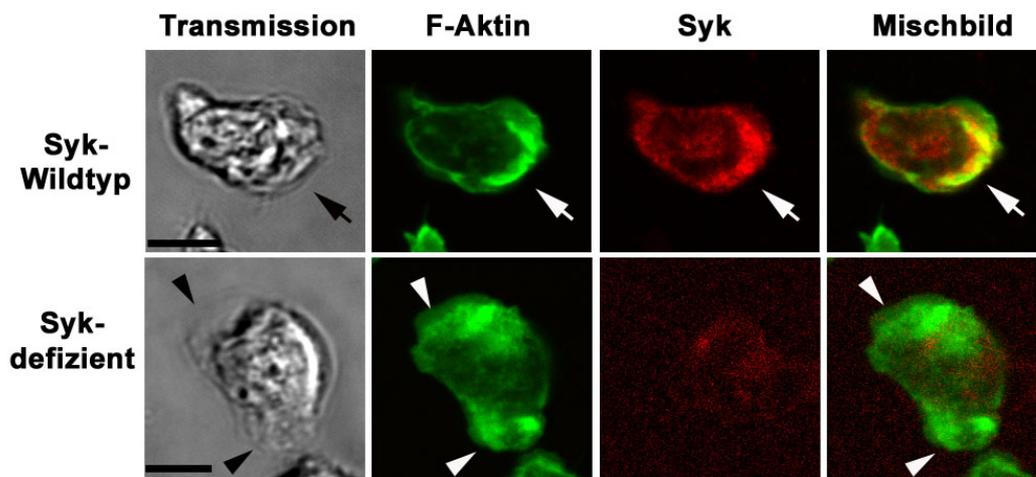


Abb. 19: Murine $\text{Syk}^{-/-}$ neutrophile Granulozyten bildeten multiple Lamellipodien. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von polarisierten murinen $\text{Syk}^{+/-}$ und $\text{Syk}^{-/-}$ neutrophilen Granulozyten. In $\text{Syk}^{+/-}$ -Zellen wurden sowohl F-Aktin als auch Syk im Lamellipodium angereichert (Pfeil). Die Kolokalisation ist in gelb gezeigt (Mischbild). Im Gegensatz dazu bildeten $\text{Syk}^{-/-}$ -PMN multiple Lamellipodien (Pfeilköpfe); Marker = 10 μm . Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4. Diskussion

4.1. Die Herstellung GFP-gekoppelter Syk-Konstrukte für die Analyse der Migration

In der vorliegenden Arbeit wurden die β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion und Migration als essentielle Schritte der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten unter Verwendung von dHL-60-Zellen als Modellsystem für neutrophile Granulozyten *in vitro* analysiert. Funktionelle Analysen wurden vorwiegend mit Hilfe EGFP-gekoppelter chimärer Proteine durchgeführt. Mit immobilisiertem Fibrinogen als bekanntem Liganden der β_2 -Integrine Mac-1 (CD11b/CD18) und gp150/95 (CD11c/CD18) (Plow *et al.*, 2000) konnte eine funktionelle Beteiligung von Syk bei der Polarisierung und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten bereits von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Schymeinsky *et al.*, 2005). Diese Daten waren mit Hilfe von Antikörperfärbungen von Syk und Hemmung der Syk-Kinaseaktivität durch den spezifischen Inhibitor Piceatannol (Oliver *et al.*, 1994) erhoben worden. Antikörperfärbungen lassen jedoch nur Untersuchungen fixierter Zellen zu, während die Dynamik der subzellulären Verteilung von Syk in lebenden Leukozyten dieser Analyse entgeht. Zudem können auch bei einem spezifischen Inhibitor wie Piceatannol unspezifische Effekte auf andere Kinasen nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. So haben Law *et al.* gezeigt, dass Piceatannol neben Syk auch die Aktivität der *Focal Adhesion Kinase* und der Src-Kinasen beeinflusst, wenn auch in weit höheren als in dieser Studie verwendeten Konzentrationen (Law *et al.*, 1999). Zudem lieferten Experimente mit Thrombozyten Syk-defizienter Mäuse und Piceatannol-behandelter humaner Plättchen unterschiedliche Ergebnisse (Law *et al.*, 1999).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde durch die Herstellung und Expression EGFP-gekoppelter Vektoren eine Methode etabliert, um Veränderungen der Proteinlokalisierung als eine Funktion von Zeit und Stimulus in lebenden Zellen beobachten zu können. Die biochemische Analyse der EGFP-Syk-Transfektanten zeigte, dass das EGFP-Syk-Konstrukt auf mRNA- und Proteinebene exprimiert wurde. Der Syk-EGFP-Vektor wurde ebenfalls auf mRNA-Ebene exprimiert, führte aber nicht zu einer detektierbaren Fluoreszenz in den transfizierten Zellen. Eine

mögliche Erklärung hierfür könnte eine falsche posttranslationelle Faltung des chimären Syk-EGFP-Proteins sein. Da der EGFP-Syk-Vektor eine zufrieden stellende Fluoreszenz in den Zellen aufwies, wurden alle weiteren Untersuchungen mit diesem Konstrukt durchgeführt.

Die Verwendung von dHL-60-Zellen, die transient verschiedene chimäre Syk-Proteine exprimierten, eröffnete verschiedene Möglichkeiten: Die Dynamik der Syk-Verteilung in lebenden Zellen konnte mit Hilfe der Videomikroskopie beurteilt werden. Effekte, die sich bei der Verwendung des Inhibitors Piceatannol gezeigt hatten, konnten auf Syk eingegrenzt werden und es bestand die Möglichkeit, durch die Mutation einzelner Bindungsstellen in der Linkerregion von Syk den Signalweg *downstream* von Syk zu untersuchen. Die Expression von EGFP allein ist für die Zelle ungiftig (Arun *et al.*, 2005). Allerdings könnten transfizierte Zellen durch die Elektroporation selbst oder die Überexpression von Syk-gekoppeltem EGFP in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Für funktionelle Analysen wurden daher zur Kontrolle EGFP-C1- bzw. EGFP-Syk-transfizierte Zellen herangezogen. Es zeigte sich, dass die EGFP-Syk-Transfektanten funktionell waren und in Bezug auf die Zellpolarisierung, Lamellipodienbildung und die Anreicherung von Syk und F-Aktin an der Zellfront ähnliche Charakteristika zeigten wie nicht-transfizierte Wildtypzellen (Schymeinsky *et al.*, 2005) bzw. EGFP-C1-Kontrollzellen. Somit konnte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein Transfektionssystem etabliert werden, das geeignet war, die Rolle von Syk bei der Migration von Leukozyten zu untersuchen.

4.2. Die Rolle von Syk bei der β_2 -Integrin-abhängigen Polarisierung und Migration

Die Untersuchungen zur Rolle von Syk bei der Polarisierung und Migration von neutrophilen Granulozyten erfolgten an transient mit EGFP-Syk transfizierten dHL-60-Zellen. Durch die mikroskopische Analyse der adhärenen Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass Syk aus dem Zytosol unstimulierter Zellen in das Lamellipodium polarisierter, auf immobilisiertem Fibrinogen adhärenter Zellen umverteilt wird, was für dHL-60-Wildtyp-Zellen bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt worden war (Schymeinsky *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung von EGFP-Syk am vorderen Zellpol nicht zeitlich

beschränkt war, sondern während der Migration über einen längeren Zeitraum konstant erhalten blieb.

Welche Funktion hat diese Umverteilung von Syk ins Lamellipodium? Durch die Anreicherung von Signalmolekülen am vorderen Zellpol transformiert die Zelle den externen Gradienten in einen internen und verstärkt ihn, so dass Richtungswahrnehmung auch über einen flachen Gradienten von ca. 2% über den Zellkörper möglich wird (Wang *et al.*, 2002; Van Haastert und Devreotes, 2004). In suspendierten Zellen bleibt Syk trotz Stimulation mit fMLP homogen verteilt (Schymeinsky *et al.*, 2005), was für eine Abhängigkeit der Syk-Umverteilung von β_2 -Integrinen spricht. Auch konnte bereits nachgewiesen werden, dass Syk nach Ligandenbindung der β_2 -Integrine tyrosinphosphoryliert wird und für das β_2 -Integrin-vermittelte *Spreading* benötigt wird (Willeke *et al.*, 2003; Mocsai *et al.*, 2002). Die Interaktion von Syk mit den β_2 -Integrinen wird neuen Erkenntnissen zufolge von ITAM-tragenden Adaptermolekülen vermittelt. Dabei phosphorylieren Src-Kinasen vermutlich nach Ligandenbindung der β_2 -Integrine das ITAM-tragende transmembrane Adaptermolekül DAP12, was zur Aktivierung von Syk führt (Mocsai *et al.*, 2006). Auch die Tatsache, dass der GEF Vav und die Adapterproteine SLP-76 und SLAP130/ADAP an der Regulierung des Zytoskeletts beteiligt sind und zu den Substraten von Syk gehören (Miranti *et al.*, 1998; Bubeck-Wardenburg *et al.*, 1998; Oberfell *et al.*, 2002; Schymeinsky *et al.*, 2006), deutet darauf hin, dass Syk die β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion mit zytoskelettaler Reorganisation verbindet und auf diese Weise in die Zellpolarisierung eingreift.

Ein Effekt von Syk auf die Zellpolarisierung konnte in der vorliegenden Arbeit durch pharmakologische Hemmung von Syk mit Piceatannol gezeigt werden. Dies führte zu exzessiver Lamellipodienbildung in stimulierten PHAkt-GFP-dHL-60-Zellen. In dHL-60-Syk-siRNA-Zellen, deren endogenes Syk auf 38% des Ausgangswertes vermindert war (Schymeinsky *et al.*, 2006), wurde eine ähnliche Polarisierungsstörung beobachtet. Die Bedeutung von Syk für die Polarisierung wurde durch Untersuchungen von Syk-defizienten murinen PMN bestätigt, die ebenfalls nach der Stimulation mit fMLP multiple Lamellipodien ausbildeten. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass Syk nicht nur essentiell für die Polarisierung von dHL-60-Zellen, sondern auch von primären neutrophilen Granulozyten ist.

4.3. *Outside-in-Signaling*

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der die Polarisierung kontrollierende Syk-Signalweg näher charakterisiert. Für die regulatorischen Untereinheiten p85 α und p85 β der Klasse IA Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) wurde eine Bindungsstelle an Syk nachgewiesen (Moon *et al.*, 2005). Es ist darüber hinaus bekannt, dass PI3Ks der Klassen IA und IB eine wichtige Rolle bei der Migration und Polarisierung von Leukozyten einnehmen (Sasaki *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Yum *et al.*, 2001; Sadhu *et al.*, 2003; Puri *et al.*, 2005). Um der Frage nachzugehen, ob Syk-vermittelte Signalwege über die PI3K von Bedeutung für Polarisierung und Migration sind, wurde durch Punktmutation ein EGFP-gekoppeltes Syk-Konstrukt erstellt, dem die Bindungsstelle für die regulatorischen Untereinheiten p85 α und p85 β der PI3K Klasse IA fehlte (EGFP-Syk Y323F). Mit Hilfe transienter Expression dieses chimären Proteins in dHL-60-Zellen konnte Syk-Tyr³²³, die Bindungsstelle für die PI3K der Klasse IA, in funktionellen Untersuchungen als eine wichtige Komponente der Zellpolarisierung identifiziert werden. Im Vergleich mit EGFP und EGFP-Syk exprimierenden Zellen war die Polarisierung deutlich gestört, was sich in der Bildung multipler Lamellipodien äußerte. Videomikroskopische Zeitrafferanalysen der Syk-Y323F-Mutanten zeigten zudem eine erhöhte zeitliche Instabilität der Lamellipodien. Mit der Umverteilung von Syk ins Lamellipodium interferierte die Mutation jedoch nicht. Somit hatte Syk-Tyr³²³ bzw. die PI3K keinen Einfluss auf die Umverteilung von Syk selbst. Hier scheinen andere Mechanismen, darunter die Syk-Kinaseaktivität und die Interaktion mit Vav (Schymeinsky *et al.*, 2006), eine Rolle zu spielen. Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass Syk-Tyr³²³ eine bedeutende Rolle bei der Bildung eines „leitenden“ Lamellipodiums bzw. bei der Hemmung lateraler Lamellipodien spielt. Der bipolare Phänotyp jedoch ist eine Notwendigkeit für die ortsgerichtete Migration (Van Haastert und Devreotes, 2004). Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Syk-Mutante, in einem chemotaktischen Gradienten gerichtet zu migrieren, gegenüber den EGFP und EGFP-Syk exprimierenden Zellen deutlich beeinträchtigt war.

Interessanterweise zeigen migrierende Leukozyten, deren RhoA gehemmt ist, einen der Syk-Y323F-Mutante ähnlichen Phänotyp mit der Ausbildung von multiplen Lamellipodien (Worthylake und Burridge, 2003). Zudem scheint RhoA bei der Lokalisierung der β_2 -Integrine an der Zellfront eine Bedeutung zuzukommen

(Worthylake *et al.*, 2001) und in dHL-60-Zellen wird die RhoA-Aktivierung durch die Expression einer dominant negativen Syk-Mutante vermindert (Shi *et al.*, 2006). Die funktionelle Bedeutung von Rho liegt jedoch am Uropod migrierender Zellen, wo es das *Detachment* des hinteren Zellpols und das Nachziehen des Zellkörpers reguliert (Ridley, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Syk neben der Kontrolle des anterioren Zellpols auch eine funktionelle Rolle beim *Detachment* des Uropods besitzt. Da ein Teil der Zellen neben einer Umverteilung von Syk an die Zellfront auch eine Anreicherung am hinteren Zellpol zeigte (Daten nicht gezeigt), sollte diese Frage Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Insgesamt war die Ausbildung des stabilen bipolaren Phänotyps jedoch nicht bei allen EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen völlig gehemmt. Eine mögliche Erklärung hierfür sind alternative Signalwege, die imstande sind, den bipolaren Phänotyp zu stabilisieren. In einem derartig bedeutenden und komplexen Prozess wie der Rekrutierung von Leukozyten zum Entzündungsgeschehen ist durchaus eine große Redundanz der vermittelnden Signalwege zu erwarten. Der Syk-vermittelte PI3K-Signalweg könnte die Schwelle für die Bildung neuer Lamellipodien in bereits polarisierten Zellen erhöhen, ohne die Ausbildung des bipolaren Phänotyps völlig zu verhindern. Daneben könnte auch die Variabilität der Expressionsstärke des EGFP-Syk Y323F-Konstrukts in den transient transfizierten Zellen eine Rolle bei der funktionellen Auswirkung der Mutation spielen.

Molekulare Grundlagen des Syk-vermittelten PI3K-Signalweges

Verschiedene Studien zeigten eine Rolle der Klasse IB PI3K für die Chemotaxis von PMN, Makrophagen und naiven T-Lymphozyten (Sasaki *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Reif *et al.*, 2004; Puri *et al.*, 2005). Zusätzlich ist bekannt, dass die katalytische Klasse IA-Untereinheit p110 δ eine wichtige Funktion bei der ortsgerichteten Migration von PMN und B-Zellen aufweist (Reif *et al.*, 2004; Sadhu *et al.*, 2003). An Syk-Tyr³²³ binden jedoch, soweit bisher bekannt, lediglich die regulatorischen Untereinheiten der PI3K Klasse IA, p85 α und p85 β (Moon *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation Syk-Y323F einen Einfluss auf die Umverteilung der PI3K-Untereinheit p110 δ hatte. Die Y323F-Mutanten waren nicht mehr in der Lage, p110 δ effizient im Lamellipodium anzureichern. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich in Syk-siRNA-Zellen, in denen die

Expression von Syk mit Hilfe der siRNA-Technik auf 38% vermindert war. Auch diese Zellen zeigten einen Defekt der Umverteilung der PI3K δ in die Lamellipodien polarisierter Zellen. In der Konsequenz war die Anreicherung von 3-Phosphoinositiden im Lamellipodium von PHAkt-GFP-Zellen nach pharmakologischer Hemmung der Syk-Kinaseaktivität vermindert. Diese Daten zeigen, dass Syk notwendig für die effiziente Umverteilung der PI3K δ an den vorderen Zellpol ist, was eine Voraussetzung für die lokalisierte Produktion von 3-Phosphoinositiden ist. Hierdurch konnte indirekt gezeigt werden, dass die PI3K δ *downstream* von Syk in einem die Zellpolarisierung kontrollierendem Signalweg liegt. Die gestörte Migration der Syk-Y323F-Mutanten könnte somit durch eine fehlende Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 an Syk, was zu einer unzureichenden Aktivierung der p110 δ -Untereinheit führte, verursacht worden sein. Ob dies durch Phosphorylierung der Untereinheit p85 α und subsequente Disinhibition von p110 δ oder durch alternative Mechanismen geschieht, konnte nicht geklärt werden. Eine direkte Phosphorylierung von p85 durch Syk ist bislang nicht gezeigt worden. Die subzelluläre Verteilung von p85 in der Syk-Mutante und den Syk-siRNA-Zellen konnte aufgrund unzureichender Bindung des Antikörpers gegen p85 nicht untersucht werden.

Auf welche Weise beeinflussen Syk und die PI3K die Polarisierung und Migration von Leukozyten? Bernardini *et al.* konnten zeigen, dass nach Ligandenbindung von fMLP an Chemokinrezeptoren die PI3K-Aktivität mit dem β_2 -Integrin LFA-1 assoziiert (Bernardini *et al.*, 2005). Verschiedene Beobachtungen veranlassten Bernardini *et al.* zu der Annahme, dass die β_2 -Integrin-assoziierte Lipidkinaseaktivität der Klasse IA PI3K-Unterfamilie zuzuordnen ist. In PMN wurde eine Rolle der PI3K Klasse IA für die β_2 -Integrin-abhängige Adhäsion gezeigt (Gao *et al.*, 2006); außerdem führte die Hemmung von Syk mit Piceatannol zu einer reduzierten PI3K-Aktivität in humanen PMN (Li *et al.*, 2006). Diese Daten weisen darauf hin, dass Syk für die Aktivierung der PI3K in Integrin-vermittelten Signalwegen von Bedeutung ist.

Zur Frage der molekularen Mechanismen von Zellpolarisierung und Chemotaxis stellten Procko und McColl ein Modell auf, das auf einer lokalen Anhäufung von PIP $_3$ beruht (Procko und McColl, 2005). Demnach stimuliert die Ligandenbindung an einen Chemokinrezeptor dessen Dissoziation in die Untereinheiten G α^{GTP} - und G $\beta\gamma$. G $\beta\gamma$

aktiviert p101/p110 γ und führt dadurch zu einer initialen Anhäufung von 3-Phosphoinositiden. Dieser initiale *Burst* der PIP₃-Produktion ist in der Lage, GEFs für Rho-Familien GTPasen zu aktivieren, darunter auch Vav (Welch *et al.*, 2003). Die kleinen GTPasen können die PI3K δ aktivieren, von der angenommen wird, dass sie essentiell für die Amplifikation der PIP₃-Produktion ist (Srinivasan *et al.*, 2003; Welch *et al.*, 2003). Zu dieser Vorstellung passt auch die Beobachtung, dass exogen zugeführtes PIP₃ allein imstande ist, eine PIP₃-Amplifikation zu induzieren (Weiner *et al.*, 2002). Eine sequentielle Aktivierung der PI3K γ und der PI3K δ konnte in humanen neutrophilen Granulozyten gezeigt werden (Condliffe *et al.*, 2005). Neue Daten weisen jedoch darauf hin, dass die PI3K δ verantwortlich für den Großteil der PIP₃-Produktion nach chemotaktischer Stimulation von neutrophilen-ähnlichen PLB-985-Zellen ist und der erste PIP₃-Peak durch die PI3K γ hierfür nicht benötigt wird (Boulven *et al.*, 2006).

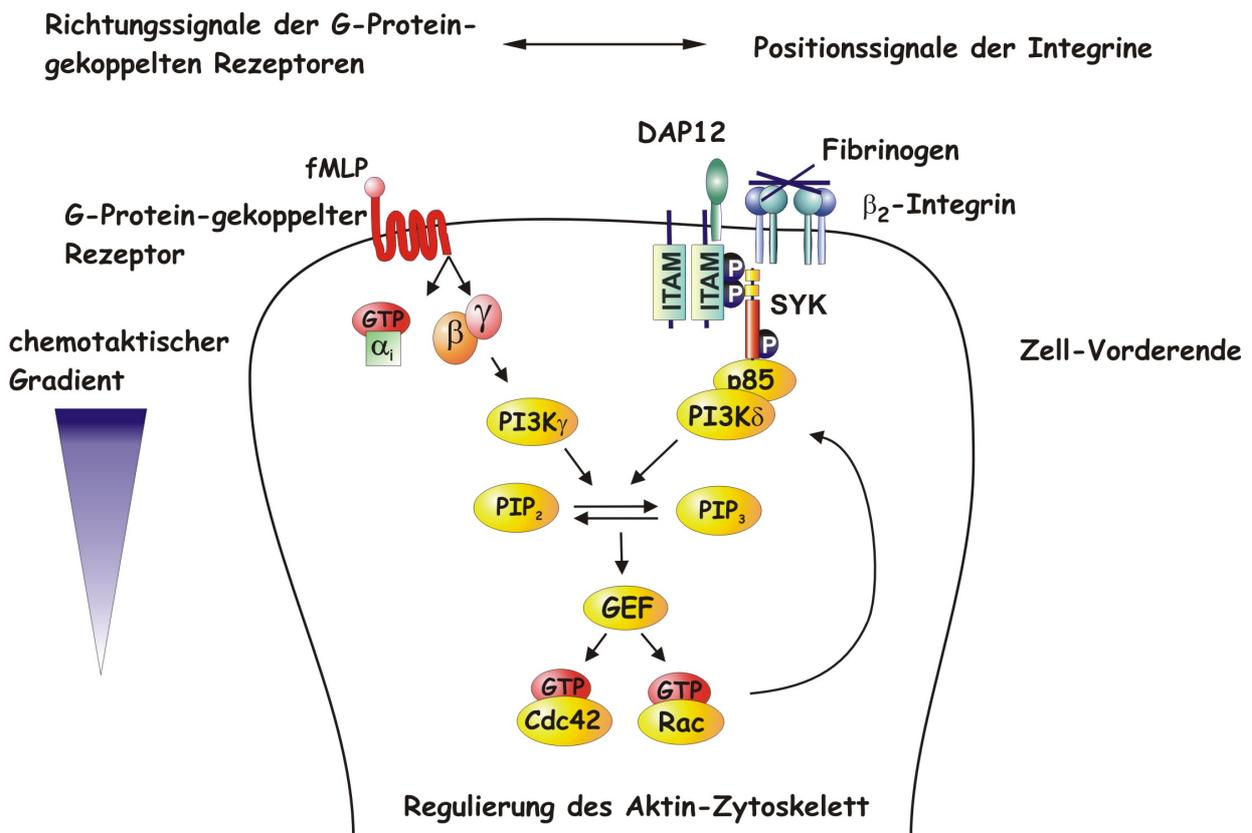


Abb. 20: Modell eines funktionellen Zusammenspiels zwischen der PI3K γ und der PI3K δ bei der Migration.

Allgemein werden die PI3K γ und die PI3K δ als kooperierende Partner in verschiedenen Signalwegen angesehen (Rommel *et al.*, 2007). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein β_2 -Integrin-vermittelter Syk-Signalweg über die regulatorische Untereinheit p85 eine PI3K γ -unabhängige Aktivierung von p110 δ und einen funktionellen *Crosstalk* zwischen Chemokin-abhängigen Richtungssignalen und Integrin-vermittelten Positionssignalen ermöglichen könnte (Abb. 20).

Da Syk in der Lage ist, GEFs für die Aktivierung von Rac zu phosphorylieren, besteht die Möglichkeit, dass Syk ebenfalls ein Bestandteil der oben beschriebenen positiven Rückkopplungsschleifen ist. Ob dies der Fall ist, konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der subzellulären Verteilung von Vav in den Syk-Y323F exprimierenden Zellen nicht geklärt werden: Die Mutation Syk-Tyr³²³ interferierte nicht mit der Kolo-kalisation von Syk und Vav im Lamellipodium, so dass sich kein Hinweis auf eine direkte Beeinflussung des Vav-Signalwegs ergab.

Die PI3Ks sind nicht die einzigen Interaktionspartner von Syk-Tyr³²³. Ein weiterer Bindungspartner von Syk-Tyr³²³ ist Cbl (Lupher *et al.*, 1998). Cbl wird nach der Ligandenbindung einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren wie Integrine und Zytokinrezeptoren tyrosinphosphoryliert (Thien und Langdon, 2001) und übernimmt verschiedene Funktionen in Tyrosinkinase-Signalwegen. Hierzu zählen die Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, die Adhäsion und die Migration (Sanjay *et al.*, 2001; Cavegion *et al.*, 2003; Schmidt, 2005). Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob die Hemmung der Interaktion von Syk und Cbl als Ursache der gestörten Migration der Y323F-Mutanten in Frage kommt. Die Analyse der intrazellulären Lokalisation von Cbl mittels Fluoreszenzmikroskopie ergab jedoch keinen Unterschied in den Syk-Mutanten im Vergleich zu den EGFP-Syk-Kontrollzellen, sondern zeigte bei beiden Transfektanten eine Kolo-kalisation von Cbl und EGFP-Syk in den Lamellipodien der transfizierten Zellen. Die hier verwendete Methode lieferte somit keinen Anhalt für eine Beteiligung von Cbl an dem beobachteten Effekt, was darauf hinweist, dass die defekte Umverteilung spezifisch die PI3K betrifft.

Sada *et al.* haben die murine Mutante Syk Y317F, die dem humanen Syk Y323F entspricht, als eine *Gain-of-Function*-Mutation beschrieben (Sada *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Expression von Syk Y317F in Mastzellen zu erhöhter FcεRI-vermittelten Phosphorylierung der Phospholipase Cγ und gesteigerter Histaminfreisetzung führte. Der *Gain-of-Function*-Effekt erstreckte sich jedoch nicht auf alle Syk-vermittelten Signalwege; z.B. war die Phosphorylierung von Rezeptor-untereinheiten, Vav und MAPK nicht gesteigert. Sada *et al.* postulieren, dass das Protoonkoprotein Cbl, welches an Syk-Tyr³¹⁷ bindet, die Kinaseaktivität von Syk negativ beeinflusst. Überexpression von Cbl führt zu erniedrigter Tyrosinphosphorylierung von Syk, so dass Cbl als endogener Regulator der Signaltransduktion und Zellaktivierung dienen könnte (Ota und Samelson, 1997). Morphologie, Phänotyp und dynamisches Verhalten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten dHL-60-Zellen ähnelten dagegen der *Loss-of-Function*-Mutante K402R, einer katalytisch inaktiven Form von Syk (Schymeinsky *et al.*, 2006). Diese Differenzen beruhen möglicherweise auf dem verwendeten Zelltyp: Sada *et al.* verwendeten für ihre Analysen RBL-2H3-Mastzellen, während in der vorliegenden Arbeit funktionelle Untersuchungen an dHL-60-Zellen durchgeführt wurden. Wahrscheinlicher ist aber, dass Syk-Tyr³²³ unterschiedliche zelluläre Funktionen übernimmt, entsprechend der Vielzahl der Aufgaben und Bindungspartner von sowohl Syk als auch der verschiedenen PI3K-Unterformen. Als ein Beispiel hierfür konnten Moon *et al.* in nicht-hämatopoetischen COS-7 Zellen erstmals eine positive Rolle von Syk-Tyr³¹⁷ in der Signaltransduktion der Syk-abhängigen Phagozytose zeigen (Moon *et al.*, 2005).

4.4. Ausblick

Das Feld der Leukozytenaktivierung und –rekrutierung wird seit Jahren mit großer Intensität erforscht. Dabei ist die wichtigste Frage noch immer ungelöst und wird kontrovers diskutiert: Welcher der vielen Rekrutierungsschritte bietet das vielversprechendste, einfachste und sicherste molekulare Ziel für therapeutische Interventionen bei entzündlichen Erkrankungen? Bisher stützen umfassende präklinische und klinische Studien vor allem die Idee einer antiinflammatorischen Therapie durch Leukozytenadhäsionshemmer, die an Integrinen ansetzen. Die β₂-Integrin-vermittelte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten wird als ein Schlüsselereignis der schädlichen Entzündungsprozesse in Folge von

Myokardinfarkten, Schlaganfällen, Ischämie-Reperfusionsschäden und rheumatoider Arthritis angesehen (Luster *et al.*, 2005). Ein Beispiel für eine anti-Adhäsionsstrategie ist Natalizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen die α_4 -Integrinkette von T_H1 -Zellen. Natalizumab blockiert die Bindung von $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) an VCAM-1 sowie die Bindung von $\alpha_4\beta_7$ an MadCAM-1 und hemmt auf diese Weise die Infiltration von Gehirn und gastrontestinalem Gewebe durch T_H1 -Zellen. Dies ermöglicht eine Behandlung der Multiplen Sklerose und des Morbus Crohn (Ghosh, 2003; Miller *et al.*, 2003). Auch die Hemmung des α_L -Integrins (CD11a), das gemeinsam mit CD18 das β_2 -Integrin LFA-1 bildet, durch die Antikörper Odulimomab und Efaluzimab erwies sich als erfolgreiche Therapie bei der *Graft versus Host*-Reaktion, der Transplantatabstoßung und der Psoriasis (Ulbrich *et al.*, 2003).

Allerdings zeigten sich diese Therapieansätze als zweischneidiges Schwert. Unter Therapie mit Natalizumab entwickelte ein kleiner Teil der behandelten Patienten eine Progressive Multifokale Leukenzephalopathie, eine tödliche opportunistische Infektion des Gehirns. Antikörper oder Chemokinantagonisten, welche die Extravasation neutrophiler Granulozyten hemmen, ziehen Symptome nach sich, die dem Leukozytenadhäsionsdefizienz-Syndrom ähnlich sind (Luster *et al.*, 2005; Yonekawa und Harlan, 2005). Die in präklinischen Studien viel versprechende antiadhäsive Therapie von Ischämie-Reperfusionsschäden (Thiagarajan *et al.*, 1997) erwies sich in klinischen Studien als enttäuschend: Rovelizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen β_2 -Integrine, war nicht in der Lage, die Infarktgröße nach einem akuten Myokardinfarkt zu verringern (Faxon *et al.*, 2002). Das *Outcome* nach einem Apoplex wurde durch die Behandlung mit UK-279,276, einem rekombinanten Glykoprotein, das selektiv die CD11b-Untereinheit des β_2 -Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) bindet, nicht verbessert (Krams *et al.*, 2002). Hier wird deutlich, dass zur Minimierung unerwünschter Nebeneffekte und zur Verbesserung des Therapieerfolgs spezifischere Inhibitoren gefunden werden müssen.

Ein alternativer Ansatz für pharmakologische Interventionen ist die Blockierung einzelner Enzyme, Adapterproteine oder Signalwege. Die große Redundanz der inflammatorischen Signalwege wirkt hierbei zwar erschwerend (Nathan, 2006), könnte aber auch für teilblockierende Effekte genutzt werden. Zur Beeinflussung der PI3K gibt es bereits präklinische und klinische Erfahrungen. Präparate, die spezifisch

p110 δ inhibieren, hemmen die Migration neutrophiler Granulozyten (Sadhu *et al.*, 2003) und verbessern den Erfolg von Tumorbehandlungen durch strahlungsinduzierte Gefäßdestruktion (Geng *et al.*, 2004). Da Syk und die PI3K beide eine essentielle Bedeutung für chemotaktische Prozesse von Leukozyten besitzen, wäre die Hemmung ihrer Interaktion eine elegante Option, in die Migration einzugreifen. Ein weiterer favorisierter Angriffspunkt sind ITAM-tragende Adaptermoleküle wie DAP12, welche die Interaktion von Syk mit den β_2 -Integrinen vermitteln (Mocsai *et al.*, 2006). Es ist jedoch kaum zu erwarten, dass hierbei nicht auch andere wichtige Zellfunktionen gestört werden.

Zu beachten ist jedoch, dass Syk auch für Zellfunktionen außerhalb der Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist. Bei fehlendem Syk ist die Lebensfähigkeit von Mäusen stark eingeschränkt. So sterben Syk-defiziente Mäuse perinatal (Turner *et al.*, 1995), die embryonale und adulte Vaskulogenese weist in Syk-chimären Mäusen Defekte auf (Abtahian *et al.*, 2003; Sebzda *et al.*, 2006). In humanen malignen Brustkarzinomgeweben scheint Syk eine der in Leukozyten entgegengesetzte Funktion bei der Migration zu haben. Syk tritt hier als Suppressor der Invasivität auf (Coopman *et al.*, 2000; Coopman und Mueller, 2006) und beeinflusst die Tumorzellmigration negativ, ein Effekt, der ebenfalls PI3K-vermittelt ist (Mahabeleshwar *et al.*, 2003). Zudem hat Syk einen hemmenden Einfluss auf die Zellteilung in Brustepithelzellen (Zyss *et al.*, 2005) und die Syk-Expression korreliert negativ mit der Entwicklung und Invasivität des Tumorgewebes (Repana *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). In B-Zell-Lymphomen dagegen wird Syk für das Wachstum benötigt (Gururajan *et al.*, 2007). Die funktionelle Rolle von Syk scheint also zelltypspezifisch zu sein. Obwohl Syk möglicherweise ein attraktives Ziel für die Behandlung Immunkomplex- und Komplement-vermittelter Erkrankungen darstellt, wie durch eine stark eingeschränkte reverse passive Arthusreaktion in Syk-knochenmarkschimären Mäusen (Schymeinsky *et al.*, 2006) und im Modell einer Mac-1- und Syk-abhängigen thrombohämorrhagischen Vaskulitis (Hirahashi *et al.*, 2006) gezeigt werden konnte, wäre deshalb im Falle eines therapeutischen Eingreifens in Syk-vermittelte Signalwege im Hinblick auf unvorhersehbare unerwünschte Wirkungen Vorsicht geboten. Ein Syk-Inhibitor (R406) befindet sich nach erfolgreichem Einsatz im Tiermodell bereits in Phase 1 der klinischen Erprobung. R406 hemmt die Syk-Kinaseaktivität, indem es an die ATP-Bindetasche

bindet, und führte zu einer verminderten Immunkomplex-vermittelten Entzündungsreaktion in der reversen passiven Arthusreaktion, zwei antikörperinduzierten Arthritismodellen und einer Kollagen-induzierten Arthritis bei Mäusen (Brasermann *et al.*, 2006; Pine *et al.*, 2006). Außerdem konnte durch Behandlung mit einem weiteren Syk-spezifischen Inhibitor (R112) die Freisetzung von Histamin und weiteren proinflammatorischen Mediatoren blockiert werden, was sich in Phase 2 der klinischen Studien bereits als signifikante Verminderung der Symptome der saisonalen allergischen Rhinitis widerspiegelte (Rossi *et al.*, 2006). Obwohl Syk auch bei der Aktivierung von Thrombozyten eine Rolle spielt (Oberfell *et al.*, 2002), ist die Blutungszeit bei Mäusen nach Behandlung mit R406 nicht verlängert. Syk scheint also nur eine untergeordnete Bedeutung für die Hämostase *in vivo* zu haben. Zudem ergaben vierwöchige Immunotoxizitäts-Studien mit Ratten keine inakzeptablen Nebenwirkungen von R406. Immunmodulatorische Effekte wie eine periphere Lymphopenie waren nach einem zweiwöchigen therapiefreien Intervall reversibel (Zhu *et al.*, 2007). Somit könnte sich die pharmakologische Hemmung von Syk als ein realisierbarer molekularer Ansatz zur Therapie entzündlicher Erkrankungen herausstellen.

5. Zusammenfassung

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten spielen eine Schlüsselrolle bei der angeborenen Immunabwehr. Ihre Rekrutierung an den Entzündungsort ist eine wesentliche Voraussetzung für die dort stattfindende Immunreaktion. Von Adhäsionsmolekülen der β_2 -Integrinfamilie vermittelte Signalwege sind für die Rekrutierung von PMN von zentraler Bedeutung. Auf die β_2 -vermittelte Adhäsion am Gefäßendothel folgen die ebenfalls β_2 -abhängige transendotheliale Extravasation und chemotaktisch gesteuerte Migration zum Ort des Entzündungsgeschehens. Voraussetzung für eine effiziente Chemotaxis ist eine genau regulierte Polarisierung der Zellen. Eine bekannte Rolle für die Polarisierung von Leukozyten besitzen sowohl die Tyrosinkinase Syk als auch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Syk-vermittelten PI3K-Signalweges bei der Kontrolle von Polarisierung und ortsgerichteter Migration neutrophiler Granulozyten genauer untersucht. Hierfür wurde das Modellsystem der differenzierten HL-60-Zellen (dHL-60-Zellen) verwendet.

Zunächst wurden EGFP-gekoppelte Syk-Expressionsvektoren hergestellt und die EGFP-Syk- und Syk-EGFP-Konstrukte mittels Elektroporation transient in dHL-60-Zellen exprimiert. Biochemische Analysen bestätigten die Expression des chimären EGFP-Syk-Proteins in den transfizierten Zellen. Das chimäre Syk-EGFP-Konstrukt wurde zwar auf mRNA-Ebene exprimiert, führte aber nicht zu einer Fluoreszenz der durch Elektroporation transfizierten Zellen. Funktionelle Analysen der EGFP-Syk-Transfektanten ergaben während der Adhäsion und Migration eine Umverteilung von EGFP-Syk an den führenden Zellpol und eine dort über längere Zeit stabile Anreicherung.

Zur näheren Charakterisierung des Syk-Signalweges wurde im zweiten Teil der Arbeit die Syk-Mutante Y323F hergestellt. Dieser Mutante fehlte die Bindungsstelle für die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K). Die temporäre Expression des EGFP-Syk Y323F-Konstruktes in dHL-60-Zellen führte zu einer eingeschränkten Polarisationsfähigkeit der dHL-60-Zellen. Dies resultierte in der Ausbildung von

multiplen Lamellipodien ohne einen definierbaren anterioren bzw. posterioren Zellpol in den Mutanten. Die exzessive Lamellipodienbildung der EGFP-Syk Y323F exprimierenden Zellen zeigte sich auch im chemotaktischen Gradienten, was zu einer stark eingeschränkten Migrationsfähigkeit führte. Obwohl EGFP-Syk Y323F ebenso wie EGFP-Syk in die Lamellipodien umverteilt wurde, war die asymmetrische Anreicherung der PI3K δ in den Syk-Mutanten gestört. Die verminderte lokale Aktivierung der PI3K spiegelte sich in einer verminderten Anhäufung von PI3K-Produkten in den Lamellipodien von PHAkt-GFP-Zellen wider, deren Syk-Kinaseaktivität mit dem Inhibitor Piceatannol gehemmt war. Da die Umverteilung von Cbl, welches ebenfalls an Tyr³²³ von Syk bindet, in den Syk-Mutanten im Vergleich zu den EGFP-Syk-Kontrollzellen nicht verändert war, scheint der beobachtete Effekt spezifisch für die PI3K zu sein. Syk-Tyr³²³ spielte darüber hinaus keine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Vav an das vordere Zellende, was sich in einer Kollokalisierung von Vav mit EGFP-Syk Y323F ebenso wie mit EGFP-Syk in den Lamellipodien zeigte. Die PI3K-Bindungsstelle von Syk scheint somit eine von Vav unabhängige Bedeutung bei der Zellpolarisation zu besitzen. Schließlich wurde die funktionelle Bedeutung von Syk bei der Polarisierung in Syk-defizienten murinen neutrophilen Granulozyten, die eine exzessive Lamellipodienbildung aufwiesen, bestätigt.

Insgesamt legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss nahe, dass die Syk-vermittelte Kontrolle des PI3K-Signalweges für die ortsgerichtete Migration und damit auch für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Entzündungsort essentiell ist. Da diese Rekrutierung eine wesentliche Voraussetzung für physiologische und pathologische Abwehrreaktionen des Organismus ist, eröffnen neue Erkenntnisse über molekulare Zusammenhänge der Kontrolle von Polarisierung und Migration möglicherweise neue Perspektiven zu therapeutischen Interventionen bei entzündlichen Erkrankungen.

Literaturverzeichnis

- Abbal C, Lambelet M, Bertaglia D, Gerbex C, Martinez M, Arcaro A, Schapira M, Spertini O. Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood*. 2006;108:3352-9.
- Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res*. 1971; 67:359-67.
- Abram CL, Lowell The expanding role for ITAM-based signaling pathways in immune cells. *Sci STKE*. 2007; re2.
- Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mocsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, Kahn ML. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*. 2000; 299:247-51
- Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci*. 1997;110:707-20.
- Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol*. 1998;141:1147-57.
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:787-820.
- Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med*. 1987;38:175-94.
- Arnaut MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*. 1990;75:1037-50.
- Arun KH, Kaul CL, Ramarao P. Green fluorescent proteins in receptor research: an emerging tool for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51:1-23.
- Baldock D, Graham B, Akhlaq M, Graff P *et al.*. Purification and characterization of human Syk produced using a baculovirus expression system. *Protein Expr Purif*. 2000;18:86-94.
- Bernardini G, Kim JY, Gismondi A *et al.* Chemoattractant induces LFA-1 associated PI 3K activity and cell migration that are dependent on Fyn signaling. *FASEB J*. 2005;19:1305-7.
- Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319:998-1008.
- Bilsland CA, Diamond MS, Springer TA. The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. *J Immunol*. 1994;152:4582-9.
- Bowen TJ, Ochs HD, Altman LC, Price TH, Van Epps DE, Brautigan DL, Rosin RE, Perkins WD, Babior BM, Klebanoff SJ, Wedgwood RJ. Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils deficient in a cell-associated glycoprotein. *J Pediatr*. 1982;101:932-40.
- Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:743-81.
- Bokoch GM. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol*. 2005;15:163-71.
- Boulven I, Levasseur S, Marois S, Pare G, Rollet-Labelle E, Naccache PH. Class IA phosphatidylinositol 3-kinases, rather than p110 gamma, regulate formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated chemotaxis and superoxide production in differentiated neutrophil-like PLB-985 cells. *J Immunol*. 2006;176:7621-7.
- Bubeck Wardenburg J, Pappu R, Bu JY, Mayer B, Chernoff J, Straus D, Chan AC. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity*. 1998;9:607-16.
- Bustelo XR. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol*. 2000;20:1461-77.
- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*. 2007;29:356-370
- Caterina MJ, Devreotes PN. Molecular insights into eukaryotic chemotaxis. *FASEB J*. 1999;5:3078-85.
- Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:547-56.
- Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 2004; 167:377-388.

- Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, Dvorak HF, Dvorak AM, Springer TA. Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes. *Immunity*. 2007
- Cavegion E, Continolo S, Pixley FJ, Stanley ER, Bowtell DD, Lowell CA, Berton G. Related Articles, Expression and tyrosine phosphorylation of Cbl regulates macrophage chemokinetic and chemotactic movement. *J Cell Physiol*. 2003;195:276-89.
- Charest PG, Firtel RA. Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J*. 2007;401:377-90.
- Condliffe AM, Davidson K, Anderson KE, Ellson CD, Crabbe T, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Turner M, Webb L, Wymann MP, Hirsch E, Ruckle T, Camps M, Rommel C, Jackson SP, Chilvers ER, Stephens LR, Hawkins PT. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood*. 2005;106:1432-40.
- Coopman PJ, Do MT, Barth M, Bowden ET, Hayes AJ, Basyuk E, Blacato JK, Vezza PR, McLeskey SW, Mangeat PH, Mueller SC. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature*. 2000;406:742-7.
- Coopman PJ, Mueller SC. The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Lett*. 2006;241:159-73.
- Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res*. 1997;46:382-91.
- Danilenko DM, Rossitto PV, Van der Vieren M, Le Trong H, McDonough SP, Affolter VK, Moore PF. A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. *J Immunol*. 1995;155:35-44.
- Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:563-98.
- Deckert M, Tartare-Deckert S, Couture C, Mustelin T, Altman A. Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity*. 1996;5:591-604.
- de Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med*. 1991;174:253-67.
- del Pozo MA, Price LS, Alderson NB *et al.* Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J*. 2000;19:2008-14.
- del Pozo MA, Schwartz MA, Hu J, Kiosses WB, Altman A, Villalba M. Guanine exchange-dependent and -independent effects of Vav1 on integrin-induced T cell spreading. *J Immunol*. 2003;170:41-7.
- Devreotes P, Janetopoulos C. Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem*. 2003;278:20445-8.
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 1990;111:3129-39.
- Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 1995;130:1473-82.
- Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol*. 1988;107:321-31.
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*. 1999;1:253-9.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007;127:514-25.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7:606-19.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420:629-35.
- El-Hillal O, Kurosaki T, Yamamura H, Kinet JP, Scharenberg AM. syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1919-24.
- Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:500-10.
- Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F; HALT-MI Investigators. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1199-204
- Fenteany G, Glogauer M. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol*. 2004;11:15-24.
- Ferguson GJ, Milne L, Kulkarni S, Sasaki T, Walker S, Andrews S, Crabbe T, Finan P, Jones G, Jackson S, Camps M, Rommel C, Wymann M, Hirsch E, Hawkins P, Stephens L.

- PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nat Cell Biol.* 2007;9:86-91.
- Franca-Koh J, Kamimura Y, Devreotes PN. Leading-edge research: PtdIns(3,4,5)P₃ and directed migration. *Nat Cell Biol.* 2007;9:15-7
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:481-507.
- Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell.* 2002;109:611-23.
- Furie MB, Tancinco MC, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood.* 1991;78:2089-97.
- Gallagher, R. S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti and R. Gallo, 1979. "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia". *Blood*, 54:3, 713-733.
- Gao XP, Zhu X, Fu J, Liu Q, Frey RS, Malik AB. Blockade of class IA phosphoinositide 3-kinase in neutrophils prevents NADPH oxidase activation- and adhesion-dependent inflammation. *J Biol Chem.* 2007;282:6116-25.
- Garcia Z, Kumar A, Marques M, Cortes I, Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J.* 2006;25:655-61.
- Geng L, Tan J, Himmelfarb E, Schueneman A, Niermann K, Brousal J, Fu A, Cuneo K, Kesicki EA, Treiberg J, Hayflick JS, Hallahan DE. A specific antagonist of the p110delta catalytic component of phosphatidylinositol 3'-kinase, IC486068, enhances radiation-induced tumor vascular destruction. *Cancer Res.* 2004;64:4893-9.
- Gevrey JC, Isaac BM, Cox D. Syk is required for monocyte/macrophage chemotaxis to CX3CL1 (Fractalkine). *J Immunol.* 2005;175:3737-45.
- Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* 2002;12:46-54.
- Ghosh S. Therapeutic value of alpha-4 integrin blockade in inflammatory bowel disease: the role of natalizumab. *Expert Opin Biol Ther.* 2003;3:995-1000.
- Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C, Dang PM, El Benna J. [Primary immune deficiencies in neutrophil functioning] *Presse Med.* 2006;35:871-8.
- Grayson MH, Van der Vieren M, Sterbinsky SA, Gallatin WM, Hoffman P, Staunton D, Bochner BS. alpha₅beta₂ integrin is a ligand for vascular cell adhesion molecule-1. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;118:263-4.
- Green CE, Schaff UY, Sarantos MR, Lum AF, Staunton DE, Simon SI. Dynamic shifts in LFA-1 affinity regulate neutrophil rolling, arrest, and transmigration on inflamed endothelium. *Blood.* 2006;107:2101-11.
- Groesch TD, Zhou F, Mattila S, Geahlen RL, Post CB. Structural basis for the requirement of two phosphotyrosine residues in signaling mediated by Syk tyrosine kinase. *J Mol Biol.* 2006;356:1222-36
- Gururajan M, Dasu T, Shahidain S, Jennings CD, Robertson DA, Rangnekar VM, Bondada S Spleen tyrosine kinase (Syk), a novel target of curcumin, is required for B lymphoma growth. *J Immunol.* 2007;178:111-21
- Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol.* 2005;6:1198-205.
- Hauert AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:838-54.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:647-62.
- Hendey B, Klee CB, Maxfield FR. Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science.* 1992;258:296-9.
- Hentzen ER, Neelamegham S, Kansas GS, Benanti JA, McIntire LV, Smith CW, Simon SI. Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood.* 2000;95:911-20.
- Hirahashi J, Mekala D, Van Ziffle J, Xiao L, Saffaripour S, Wagner DD, Shapiro SD, Lowell C, Mayadas TN. Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity.* 2006;25:271-83.
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* 2000;287:1049-53.

- Hornstein I, Alcover A, Katzav S. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal*. 2004;16:1-11.
- Iglesias PA, Levchenko A. Modeling the cell's guidance system. *Sci STKE*. 2002;2002:RE12.
- Iijima M, Devreotes P. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell*. 2002;109:599-610.
- Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol*. 2002;22:6582-91.
- Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.
- Jin T, Zhang N, Long Y, Parent CA, Devreotes PN. Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. *Science*. 2000;287:1034-6.
- Johnson-Leger C, Imhof BA. Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell Tissue Res*. 2003;314:93-105.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:615-75.
- Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:546-59.
- Kirfel G, Rigort A, Borm B, Herzog V. Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *Eur J Cell Biol*. 2004;83:717-24.
- Knight B, Laukaitis C, Akhtar N, Hotchin NA, Edlund M, Horwitz AR. Visualizing muscle cell migration in situ. *Curr Biol*. 2000;10:576-85.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005;53:505-17.
- Koyasu S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol*. 2003;4:313-9.
- Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA; ASTIN Study Investigators. Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): an adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:2543-8.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
- Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Ministri K, Hughes PE, Forsyth J, Turner M, Shattil SJ, Ginsberg MH, Tybulewicz VL, Phillips DR. Genetic and pharmacological analyses of Syk function in alphaIIb beta3 signaling in platelets. *Blood*. 1999;93:2645-52.
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol*. 2004;1:95-104.
- Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*. 1999;400:382-6.
- Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R, Nurnberg B. Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem*. 1998;273:7024-9.
- Levchenko A, Iglesias PA. Models of eukaryotic gradient sensing: application to chemotaxis of amoebae and neutrophils. *Biophys J*. 2002;82:50-63.
- Ley K, Reutershan J. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 2):97-133.
- Ley K, Zarbock A. Hold on to your endothelium: postarrest steps of the leukocyte adhesion cascade. *Immunity*. 2006;25:185-7.
- Li B, Allendorf DJ, Hansen R, Marroquin J, Ding C, Cramer DE, Yan J. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol*. 2006;177:1661-9.
- Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*. 2000;287:1046-9.
- Li Z, Hannigan M, Mo Z, Liu B, Lu W, Wu Y, Smrcka AV, Wu G, Li L, Liu M, Huang CK, Wu D. Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell*. 2003;114:215-27.
- Liu L, Puri KD, Penninger JM, Kubes P. Leukocyte PI3K{gamma} and PI3K{delta} have temporally distinct roles for leukocyte recruitment in vivo. *Blood*. 2007; 110:1191-8.
- Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD, Silverstein SC. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:1044-8.
- Lowell CA, Fumagalli L, Berton G. Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol*. 1996;133:895-910

- Lub M, van Kooyk Y, Figdor CG. Competition between lymphocyte function-associated antigen 1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) for binding to intercellular adhesion molecule-1 (CD54). *J Leukoc Biol.* 1996;59:648-55.
- Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:619-47.
- Lupher ML Jr, Rao N, Lill NL, Andoniou CE, Miyake S, Clark EA, Druker B, Band H. Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323. *J Biol Chem.* 1998;273:35273-81
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 2005;6:1182-90.
- Mahabeleshwar GH, Kundu GC. Syk, a protein-tyrosine kinase, suppresses the cell motility and nuclear factor kappa B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2003;278:6209-21.
- Majeed M, Cavegion E, Lowell CA, Berton G. Role of Src kinases and Syk in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J Leukoc Biol.* 2001;70:801-11.
- Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* 2005;26:388-95.
- Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW; International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2003;348:15-23.
- Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS, Shattil SJ. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol.* 1998;8:1289-99.
- Mocsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol.* 1999;162:1120-6
- Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 2002;16:547-58.
- Mocsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol.* 2006;7:1326-33.
- Moon KD, Post CB, Durden DL, Zhou Q, De P, Harrison ML, Geahlen RL. Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2005;280:1543-51.
- Moore SL, Selfors LM, Fredericks J, Breit T, Fujikawa K, Alt FW, Brugge JS, Swat W. Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:6364-73.
- Mouneimne G, DesMarais V, Sidani M, Scemes E, Wang W, Song X, Eddy R, Condeelis J. Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. *Curr Biol.* 2006;16:2193-205.
- Narang A, Subramanian KK, Lauffenburger DA. A mathematical model for chemoattractant gradient sensing based on receptor-regulated membrane phospholipid signaling dynamics. *Ann Biomed Eng.* 2001;29:677-91.
- Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol.* 1989;109:1341-9.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:173-82.
- Nishio M, Watanabe K, Sasaki J, Taya C, Takasuga S, Iizuka R, Balla T, Yamazaki M, Watanabe H, Itoh R, Kuroda S, Horie Y, Forster I, Mak TW, Yonekawa H, Penninger JM, Kanaho Y, Suzuki A, Sasaki T. Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase SHIP1. *Nat Cell Biol.* 2007;9:36-44
- Niu J, Profirovic J, Pan H, Vaiskunaite R, Voyno-Yasenetskaya T. G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production. *Circ Res.* 2003; 93:848-56.
- Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 1999;144:1235-44.
- Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 2005;26:157-65.
- Obergfell A, Judd BA, del Pozo MA, Schwartz MA, Koretzky GA, Shattil SJ. The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIb beta3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2001;276:5916-23

- Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]_{IIb}[\beta]_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2002;157:265-75.
- Oliver JM, Burg DL, Wilson BS, McLaughlin JL, Geahlen RL. Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J Biol Chem.* 1994;269:29697-703.
- Ota Y, Samelson LE. The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science.* 1997;276:418-20.
- Pereira S, Lowell C. The Lyn tyrosine kinase negatively regulates neutrophil integrin signaling. *J Immunol.* 2003;171:1319-27.
- Pestonjamas KN, Forster C, Sun C, Gardiner EM, Bohl B, Weiner O, Bokoch GM, Glogauer M. Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation during chemotaxis. *Blood.* 2006;108:2814-20
- Petri B, Bixel MG. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J.* 2006;273:4399-407.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006 27;203:2569-75.
- Pine PR, Chang B, Schoettler N, Banquerigo ML, Wang S, Lau A, Zhao F, Grossbard EB, Payan DG, Brahn E. Inflammation and bone erosion are suppressed in models of rheumatoid arthritis following treatment with a novel Syk inhibitor. *Clin Immunol.* 2007
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 2000 21;275:21785-8.
- Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003; 112:453-65.
- Popa-Nita O, Rollet-Labelle E, Thibault N, Gilbert C, Bourgoin SG, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol.* 2007
- Postma M, Van Haastert PJ. A diffusion-translocation model for gradient sensing by chemotactic cells. *Biophys J.* 2001;81:1314-23.
- Prisco A, Vanes L, Ruf S, Trigueros C, Tybulewicz VL. Lineage-specific requirement for the PH domain of Vav1 in the activation of CD4+ but not CD8+ T cells. *Immunity.* 2005;23:263-74.
- Procko E, McColl SR. Leukocytes on the move with phosphoinositide 3-kinase and its downstream effectors. *Bioessays.* 2005;27:153-63.
- Puri KD, Doggett TA, Huang CY, Douangpanya J, Hayflick JS, Turner M, Penninger J, Diacovo TG. The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood.* 2005;106:150-7.
- Puri KD, Doggett TA, Douangpanya J, Hou Y, Tino WT, Wilson T, Graf T, Clayton E, Turner M, Hayflick JS, Diacovo TG. Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood.* 2004;103:3448-56.
- Rappel WJ, Thomas PJ, Levine H, Loomis WF. Establishing direction during chemotaxis in eukaryotic cells. *Biophys J.* 2002;83:1361-7.
- Reif K, Okkenhaug K, Sasaki T, Penninger JM, Vanhaesebroeck B, Cyster JG. Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol.* 2004;173:2236-40.
- Repana K, Papazisis K, Foukas P, Valeri R, Kortsaris A, Deligiorgi E, Kyriakidis D. Expression of Syk in invasive breast cancer: correlation to proliferation and invasiveness. *Anticancer Res.* 2006;26:4949-54
- Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 15):2713-22.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302:1704-9.
- Rinnerthaler G, Geiger B, Small JV. Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membrane ruffles and microtubules. *J Cell Biol.* 1988;106:747-60.
- Rossi AB, Herlaar E, Braselmann S, Huynh S, Taylor V, Frances R, Issakani SD, Argade A, Singh R, Payan DG, Masuda ES. Identification of the Syk kinase inhibitor R112 by a human mast cell screen. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:749-55.
- Rommel C, Camps M, Ji H. PI3Kdelta and PI3Kgamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol.* 2007;7:191-201.
- Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-928.
- Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem (Tokyo).* 2001;130:177-86.
- Sada K, Zhang J, Siraganian RP. Point mutation of a tyrosine in the linker region of Syk results in a gain of function. *J Immunol.* 2000 1;164:338-44.

- Sadhu C, Masinovsky B, Dick K, Sowell CG, Staunton DE. Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J Immunol*. 2003;170:2647-54.
- Sanjay A, Houghton A, Neff L, DiDomenico E, Bardelay C, Antoine E, Levy J, Gailit J, Bowtell D, Horne WC, Baron R. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol*. 2001;152:181-95.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. 2000;287:1040-6.
- Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med*. 1998;188:119-31.
- Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:907-19.
- Schreiber TH, Shinder V, Cain DW, Alon R, Sackstein R. Shear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T-cell transmigration: implications for locomotion and the multistep paradigm. *Blood*. 2007;109:1381-6.
- Schymeinsky J, Then C, Walzog B. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J Cell Physiol*. 2005;204:614-22.
- Schymeinsky J, Sindrilaru A, Frommhold D, Sperandio M, Gerstl R, Then C, Mocsai A, Scharffetter-Kochanek K, Walzog B. The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration. *Blood*. 2006;108:3919-27.
- Sebzda E, Hibbard C, Sweeney S, Abtahian F, Bezman N, Clemens G, Maltzman JS, Cheng L, Liu F, Turner M, Tybulewicz V, Koretzky GA, Kahn ML. Syk and Slp-76 mutant mice reveal a cell-autonomous hematopoietic cell contribution to vascular development. *Dev Cell*. 2006;11:349-61.
- Servant G, Weiner OD, Neptune ER, Sedat JW, Bourne HR. Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol Biol Cell*. 1999;10:1163-78.
- Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*. 2000;287:1037-40.
- Shi Y, Tohyama Y, Kadono T, He J, Shahjahan Miah SM, Hazama R, Tanaka C, Tohyama K, Yamamura H. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood*. 2006;107:4554-62.
- Silverman MA, Shoag J, Wu J, Koretzky GA. Disruption of SLP-76 interaction with Gads inhibits dynamic clustering of SLP-76 and FcepsilonRI signaling in mast cells. *Mol Cell Biol*. 2006;26:1826-38.
- Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*. 2005;7:151-85.
- Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA. Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. *J Immunol*. 1992;149:2765-71.
- Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest*. 1989;83:2008-17.
- Sperandio M, Pickard J, Unnikrishnan S, Acton ST, Ley K. Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods Enzymol*. 2006;416:346-71.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-14.
- Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne HR. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol*. 2003;160:375-85.
- Stanyon CA, Bernard O. LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:389-94.
- Suire S, Condliffe AM, Ferguson GJ, Ellson CD, Guillou H, Davidson K, Welch H, Coadwell J, Turner M, Chilvers ER, Hawkins PT, Stephens L. Gbetagammagamma and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol*. 2006;8:1303-9.
- Sun CX, Downey GP, Zhu F, Koh AL, Thang H, Glogauer M. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood*. 2004;104:3758-65.
- Taylor AD, Neelamegham S, Hellums JD, Smith CW, Simon SI. Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. *Biophys J*. 1996;71:3488-500.

- Thiagarajan, R. R., Winn, R. K., Harlan, J. M. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb. Haemost.* 1997;78:310-314
- Thien CB, Langdon WY. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:294-307.
- Tohya K, Kimura M. Ultrastructural evidence of distinctive behavior of L-selectin and LFA-1 (alphaLbeta2 integrin) on lymphocytes adhering to the endothelial surface of high endothelial venules in peripheral lymph nodes. *Histochem Cell Biol.* 1998;110:407-16.
- Tomasevic N, Jia Z, Russell A, Fujii T, Hartman JJ, Clancy S, Wang M, Beraud C, Wood KW, Sakowicz R. Differential Regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry.* 2007;46:3494-502.
- Turner M, Billadeau DD. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:476-86.
- Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today.* 2000;21:148-54.
- Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature.* 1995 16;378:298-302.
- Underhill DM, Goodridge HS. The many faces of ITAMs. *Trends Immunol.* 2007;28:66-73.
- Ulbrich H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 c;24:640-7.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997 15;11:2295-322.
- Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DE, Gallatin WM. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity.* 1995;3:683-90.
- Van Haastert PJ, Devreotes PN. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:626-34.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:535-602.
- Van Keymeulen A, Wong K, Knight ZA, Govaerts C, Hahn KM, Shokat KM, Bourne HR. To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front. *J Cell Biol.* 2006 31;174:437-45.
- Vicente-Manzanares M, Cruz-Adalia A, Martin-Cofreces NB, Cabrero JR, Dosil M, Alvarado-Sanchez B, Bustelo XR, Sanchez-Madrid F. Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood.* 2005;105:3026-34.
- von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell.* 1995;82:989-99.
- Walzog B, Gaehtgens P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News Physiol Sci.* 2000;15:107-113.
- Walzog B, Scharffetter-Kochanek K, Gaehtgens P. Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am J Physiol.* 1999;276:G1125-30.
- Walzog B, Schuppan D, Heimpel C, Hafezi-Moghadam A, Gaehtgens P, Ley K. The leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen. *Exp Cell Res.* 1995;218:28-38.
- Wang F, Herzmark P, Weiner OD, Srinivasan S, Servant G, Bourne HR. Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol.* 2002;4:513-8.
- Wang L, Wang JP, Song XM, He YL Spleen tyrosine kinase (L) suppresses breast cancer development by downregulating the expression of cyclin D1, ID1, B-myb and Fra1 *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007;87:85-9
- Weiner OD. Rac activation: P-Rex1 - a convergence point for PIP(3) and Gbetagamma? *Curr Biol.* 2002;12:R429-31.
- Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.* 2003;546:93-7.
- Welch MD. The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.* 1999; 9:423-7.
- Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 2005;85:1159-204.
- Willeke T, Behrens S, Scharffetter-Kochanek K, Gaehtgens P, Walzog B. Beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated signaling involves tyrosine phosphorylation of c-Cbl in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2000;68:284-92.

- Willeke T, Schymeinsky J, Prange P, Zahler S, Walzog B. A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2003;74:260-9.
- Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2001;167:1601-8.
- Wong K, Pertz O, Hahn K, Bourne H. Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:3639-44.
- Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol.* 2001;154:147-60.
- Worthylake RA, Burridge K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem.* 2003;278:13578-84.
- Wright SD, Rao PE, Van Voorhis WC, Craigmyle LS, Iida K, Talle MA, Westberg EF, Goldstein G, Silverstein SC. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:5699-703.
- Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:7734-8.
- Wu H, Yan Y, Backer JM. Regulation of class IA PI3Ks. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35:242-4.
- Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1436:127-50.
- Yankee TM, Keshvara LM, Sawasdikosol S, Harrison ML, Geahlen RL. Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain. *J Immunol.* 1999;163:5827-35
- Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol.* 2005;77:129-40.
- Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol.* 1998;18:1379-87.
- Yum HK, Arcaroli J, Kupfner J, Shenkar R, Penninger JM, Sasaki T, Yang KY, Park JS, Abraham E. Involvement of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil activation and the development of acute lung injury. *J Immunol.* 2001;167:6601-8.
- Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell.* 2003;114:201-14.
- Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen Tyrosine Kinase Syk Is Necessary for E-Selectin-Induced alpha(L)beta(2) Integrin-Mediated Rolling on Intercellular Adhesion Molecule-1. *Immunity.* 2007;26:773-83
- Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, Siraganian RP. Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem.* 2000;275:35442-7.
- Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* 2000;173:39-51.
- Zhu Y, Herlaar E, Masuda ES, Burleson GR, Nelson AJ, Grossbard EB, Clemens GR. Immunotoxicity assessment for the novel Spleen tyrosine kinase inhibitor R406. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;221:268-77
- Zioncheck TF, Harrison ML, Isaacson CC, Geahlen RL. Generation of an active protein-tyrosine kinase from lymphocytes by proteolysis. *J Biol Chem.* 1988;263:19195-202.
- Zyss D, Montcourrier P, Vidal B, Anguille C, Merezegue F, Sahuquet A, Mangeat PH, Coopman PJ. The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer Res.* 2005;65:10872-80

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AKT/PKB	Proteinkinase B
Arf	<i>ADP-ribosylation Factor</i>
Arp2/3	<i>Actin-related Proteins 2/3</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bandpass
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cystein
[Ca ²⁺]	Calciumionenkonzentration
Cbl	<i>Casitas B Lymphoma Family Molecules</i>
Cdc42	Ras-verwandtes G-Protein
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV-Promoter	<i>Cytomegalovirus immediate early Promoter</i>
COS-7-Zellen	Nierenfibroblasten-Zelllinie, gewonnen aus der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
CR	Komplementrezeptor
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DAP12	<i>DNAX activating protein 12</i>
dHL-60	differenzierte HL-60-Zellen
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DNase	DNA-Hydrolase
dNTPs	desoxyribo-Nukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbammat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent Protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. und andere)
F	Phenylalanin
Fc	<i>Fragment crystalline</i> (kristallisierbares Fragment von Antikörpern)
FcR	Fc-Rezeptor; Rezeptoren für verschiedene Immunglobulinisotypen (CD64, CD32 und CD16)
FcγR	IgG-Rezeptor (Fc-spezifisch)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
fdw	<i>forward</i>
Fgr	Fgr ist ein Protoonkogen und ein Mitglied der Src-Tyrosinkinasen-Familie
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAP	GTPase-aktivierendes Protein

GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GEF	<i>Guanine Nucleotide-exchange Factor</i>
G-Protein	Guaninnucleotide-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GTPase	GTP-Hydrolase
Gαβγ	trimeres G-Protein
Hck	<i>Hematopoietic Cell Kinase</i>
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2'-Ethansulfonsäure
HL-60	humane promyelozytische Leukämie
HR	<i>high Resolution</i>
ICAM-1	<i>intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IG	Immunglobulin
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's Media</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
IP3	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
Jurkat	humane T-Zell Leukämie
kb	Kilobasenpaare
LAD	Leukozytenadhäsionsdefizienz
LB-Medium	<i>lysogeny broth-Medium</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated Antigen-1</i>
LIMK	<i>LIMK-Domain-containing Kinase</i>
LSM	<i>Laser scanning Microscope</i>
Lyn	lck/yes-verwandte neue Tyrosinkinase der Src-Familie
LY294002	<i>2-(4-Morpholinyl)-8-Phenyl-4H-1-Benzopyran-4-one Hydrochloride</i>
M	molar
Mac-1	<i>Macrophage Antigen-1</i>
MadCAM	<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MCS	<i>multiple Cloning Site</i>
Met	Methionin
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N _A	numerische Apertur
P	Phosphat
PAK	<i>p21-activated Kinase</i>
PBS	<i>Phosphat buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PH-Domäne	Plekstrin-homologe Domäne
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PIP ₃ /(PI(3,4,5)P ₃)	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PLB-985	humane promyelozytische Leukämie
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PtdIns	Phosphoinositide
PTK	Proteintyrosinkinase
Rab	<i>ras-related in brain</i> ; Die Rab-Familie gehört zur Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen

Rac	Ras-verwandtes G-Protein
Ran	Ras-verwandtes G-Protein
Ras	<i>Rat Sarcoma</i> (Proto-Onkogen, das für ein kleines G-Protein codiert)
RBL-2H3	basophile Leukämiezelllinie aus der Ratte
rev	<i>reversed</i>
Rho	die Familie der Rho-GTPasen gehört zur Superfamilie der kleinen GTPasen
RNA	<i>ribonucleic Acid</i>
RNAse	RNA-Hydrolase
Rock	<i>Rho-dependent coiled-coil Kinase</i>
RPMI	Zellkulturmedium aus dem Roswell Park Memorial Institut
RT	reverse Transkriptase
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SH2-Domäne	<i>Src homology 2-Domäne</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLAP/ADAP	<i>SLP76 associated Protein</i>
SLP-76	<i>SH2 Domain containing Leukocyte Phosphoprotein of 76 kDa</i>
Src	<i>Rous Sarcoma Oncogene cellular Homolog</i>
Syk	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
THP-1	akute humane monozytische Leukämie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaureat
Tyr	Tyrosin
U	<i>Units</i> (Enzymeinheiten)
Vav	'onc F' Protoonkogen; <i>GTP exchange factor</i> (GEF) für Rho-GTPasen
VCAM	<i>vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLA	<i>very late Antigen</i>
WASP	<i>Wiskott–Aldrich Syndrome Protein</i>
WAVE	<i>WASP-Family Verprolin homologous Protein</i>
WEHI-3B	humane myelomonozytäre Leukämie
WT	Wildtyp
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosinrest

Danksagung

Frau Professor Dr. Barbara Walzog gilt mein ganz besonderer Dank für die Möglichkeit, diese interessante Arbeit durchzuführen, für ihre engagierte Förderung und für die zahllosen wertvollen Anregungen, Diskussionen und Beratungen.

Bei Herrn Dr. Jürgen Schymeinsky möchte ich mich besonders herzlich für die exzellente Betreuung und die kontinuierliche Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Ich danke Frau Silvia Weidner für die hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Ronald Gerstl danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der von ihm hergestellten Syk-siRNA-Zellen.

Ich möchte mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Labors für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Ulrich Pohl danke ich für die Unterstützung innerhalb des Lehrstuhls.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. Henry Bourne, University of California, San Francisco, USA, für die Zusendung der PHAkt-GFP-Zellen.

Herrn Professor Dr. Attila Mocsai, Semmelweis University, Budapest, Ungarn, danke ich für die Bereitstellung der Syk-Knochenmark-chimären Mäuse.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Doktorarbeit; insbesondere danke ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Siess für die Aufnahme in das DFG-Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ und Herrn Professor Dr. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit zur Teilnahme am Promotionsstudium „Molekulare Medizin“.

Curriculum vitae

Cornelia Then
*26.02.1981 in Ulm

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1987-1991	Grundschule Giengen, Baden-Württemberg
1991-2000	Margarete-Steiff-Gymnasium Giengen, Abitur
2000-2007	Medizinstudium an der LMU München
09/2002	Physikum
08/2003	1. Staatsexamen
09/2005	2. Staatsexamen
04/2007	3. Staatsexamen (Gesamtnote „sehr gut“)
05/2007	Approbation, erteilt von der Regierung von Oberbayern

Promotion:

2004-2008	Promotion am Physiologischen Institut der Medizinischen Fakultät der LMU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Walzog
03/2004-08/2005	Teilnahme am Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ im Rahmen des Förderprogrammes für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München
03/2006-07/2007	Stipendium im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“

Ärztliche Tätigkeit:

Seit 08/2007	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Klinikums der Universität Regensburg
--------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Publikationen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Publikationen

J. Schymeinsky[#], **C. Then**[#], A. Sindrilaru, R. Gerstl, Z. Jakus, V.L. Tybulewicz, K. Scharffetter-Kochanek, B. Walzog. Syk-Mediated Translocation of PI3Kdelta to the Leading Edge Controls Lamellipodium Formation and Migration of Leukocytes. PLoS ONE. 2007; 2:e1132

[#]These authors contributed equally to this work

J. Schymeinsky, A. Sindrilaru, D. Frommhold, M. Sperandio, R. Gerstl, **C. Then**, A. Mocsai, K. Scharffetter-Kochanek, B. Walzog. The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for β_2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration. Blood. 2006;108:3919-27

J. Schymeinsky, **C. Then**, B. Walzog. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. J Cell Physiol. 2005;204:614-22

Kongressbeiträge

J. Schymeinsky, **C. Then**, A. Sindrilaru, R. Gerstl, Z. Jakus, K. Scharffetter-Kochanek B. Walzog. Syk is required for neutrophil migration and wound healing: evidence for an involvement of PI3K δ signaling. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, 25.-28.03.2007, Hannover. Acta Physiol. 189 (Suppl. 653): O25-2, 2007

C. Then, J. Schymeinsky, A. Sindrilaru, A. Mocsai, K. Scharffetter-Kochanek and B. Walzog. The control of leukocyte polarization and migration via the non-receptor tyrosine kinase Syk involves PI3-kinase. Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, 12.-14.10.2006, München. J Vasc Res. 43:545-545, 2006

C. Then, J. Schymeinsky and B. Walzog. The control of leukocyte polarization and migration via the non-receptor tyrosine kinase Syk involves PI3-kinase. Joint Meeting of the German Society of Physiology and the Federation of European Physiological Societies, 26.-29-03.2006, München. Acta Physiol. 186 (Suppl. 650): PT07P-22, 2006

J. Schymeinsky, D. Frommhold, M. Sperandion, R. Gerstl, **C. Then**, A. Mocsai, B. Walzog. The Vav binding site of Syk at Tyr 348 is critical for β_2 integrin (CD11/Cd18)-mediated neutrophil migration. Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, 12.-14.10.2006, München. J Vasc Res. 43:577-577, 2006

R. Gerstl, **C. Then**, K. Lay, J. Schymeinsky, B. Walzog. A putative role of β_2 integrin-mediated signaling via Syk and HIP-55 for endocytosis in leukocytes. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, 06.-09.03.2005 Göttingen. Eur J Physiol. 499 (Suppl. 1): P 21 – 7, 2005

J. Schymeinsky, **C. Then**, B. Walzog. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie, 07.-09.10.2004, Berlin. J Vasc Res. 41: 453-454, 2004