

Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
ehem. Direktor: Prof. Dr. D. Schlöndorff,  
komm. Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**MOLEKULARE KLONIERUNG, STABILE TRANSFEKTION UND  
FUNKTIONELLE EXPRESSION DER MURINEN  
CHEMOKINREZEPTOREN Ccr2 UND Ccr5**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Christopher E. Simonis**

aus  
Boston, USA

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Walter Hofmann  
Prof. Dr. med. Franz-Xaver Beck

Betreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer.nat. B. Luckow

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von PD Dr. rer. nat. B. Luckow in der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik (ehem. Direktor Prof. Dr. med. D. Schlöndorff) an der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in der Originalpublikation:

Mack, M., Cihak, J., **Simonis, C.**, Luckow, B., Proudfoot, A. E., Plachy, J., Brühl, H., Frink, M., Anders, H. J., Vielhauer, V., Pfirstinger, J., Stangassinger, M., Schlöndorff, D.

***"Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice."***

J Immunol, 2001, **166**(7): 4697-704

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der bezeichneten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Christopher E. Simonis, München, den 19.04.2008

**Meiner Mutter Judy  
(1947-1989)**

*„One must learn the science, to practice the art.“*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE ENTDECKUNG DER CHEMOKINE UND IHRER REZEPTOREN .....	1
1.2	CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN .....	3
1.2.1	Struktur und Klassifikation der Chemokine .....	3
1.2.2	Struktur und Klassifikation der Chemokinrezeptoren .....	6
1.2.3	Chemokinrezeptor-assoziierte Signaltransduktion .....	8
1.2.4	Chemokinrezeptoren und Leukozytenmigration .....	10
1.3	DER CHEMOKINREZEPTOR CCR2.....	13
1.3.1	Der humane Chemokinrezeptor CCR2.....	13
1.3.2	Der murine Chemokinrezeptor Ccr2 .....	15
1.3.3	Physiologische und pathophysiologische Rolle von CCR2.....	16
1.4	DER CHEMOKINREZEPTOR CCR5.....	19
1.4.1	Der humane Chemokinrezeptor CCR5.....	19
1.4.2	Der murine Chemokinrezeptor Ccr5 .....	23
1.4.3	Physiologische und pathophysiologische Rolle von CCR5.....	24
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>28</b>
2.1	PRÄPARATION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN .....	28
2.1.1	Isolierung von DNA .....	28
2.1.2	Isolierung von RNA .....	30
2.1.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	31
2.1.4	Gelelektrophorese .....	31
2.2	ENZYMATISCHE MANIPULATION VON NUKLEINSÄUREN.....	32
2.2.1	Restriktionsverdau.....	33
2.2.2	Ligation .....	33
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion .....	34
2.2.4	Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	36
2.2.5	Enzymatische Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren.....	37
2.3	KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN.....	39
2.3.1	Der Plasmidvektor <i>pCR-Script</i> .....	39
2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	40
2.3.3	Identifizierung von rekombinanten Klonen.....	41
2.4	TRANSFEKTION UND EUKARYONTISCHE PROTEINEXPRESSION.....	41
2.4.1	Kulturbedingungen der <i>CHO/dhFr<sup>-</sup></i> -Zellen.....	42
2.4.2	Der Expressionsvektor <i>pEF-DHFR</i> .....	42
2.4.3	Transfektion von CHO-Zellen mittels Elektroporation.....	43
2.4.4	Selektion und Co-Amplifikation von transfizierten CHO-Zellen.....	43
2.4.5	Einfrieren und Auftauen von CHO-Zellen .....	44
2.5	PROTEINNACHWEIS UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN.....	45
2.5.1	Herstellung polyklonaler Anti-Peptid-Immunsereen .....	45
2.5.2	Immunoblotting (Western Blot) .....	45

2.5.3	Durchflusszytometrie .....	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
3.1	KLONIERUNG VON CCR2 UND CCR5 .....	49
3.1.1	Isolierung und Amplifikation der kodierenden Sequenzen von Ccr2 und Ccr5 .....	49
3.1.2	Konstruktion der Plasmide <i>pmCCR2</i> und <i>pmCCR5</i> .....	50
3.1.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit <i>pmCCR2</i> und <i>pmCCR5</i> .....	51
3.1.4	Sequenzierung und Analyse der klonierten Ccr2- und Ccr5-DNA-Fragmente .....	53
3.2	HERSTELLUNG DER ZELLINIEN <i>CHO-MCCR2</i> UND <i>CHO-MCCR5</i> .....	60
3.2.1	Die Expressionskonstrukte <i>pEF-mCCR2</i> und <i>pEF-mCCR5</i> .....	61
3.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit <i>pEF-mCCR2</i> und <i>pEF-mCCR5</i> .....	62
3.2.3	Transfektion von <i>CHO/dhFr<sup>-</sup></i> -Zellen mit <i>pEF-mCCR2</i> und <i>pEF-mCCR5</i> .....	64
3.3	KONTROLLE DER GENOMISCHEN INTEGRATION, TRANSKRIPTION UND OBERFLÄCHEN- EXPRESSION VON CCR2 UND CCR5 IN STABIL TRANSFIZIERTEN CHO-ZELLEN .....	66
3.3.1	Nachweis der genomischen Integration der Ccr2- bzw. Ccr5-Expressionskassette .....	66
3.3.2	Nachweis der Ccr2- und Ccr5-Expression auf mRNA-Ebene .....	67
3.3.3	Nachweis der Ccr2-Expression auf Proteinebene .....	69
3.3.4	Nachweis von Ccr2- bzw. Ccr5-Protein auf der Zelloberfläche .....	69
3.4	STEIGERUNG DER EXPRESSION VON CCR2 UND CCR5 IN ÜBEREXPRIMIERENDEN ZELLINIEN DURCH GEN-AMPLIFIKATION .....	72
3.5	NACHWEIS EINER FUNKTIONELLEN EXPRESSION DER CHEMOKINREZEPTOREN CCR2 UND CCR5 IN STABIL TRANSFIZIERTEN CHO-ZELLEN .....	74
3.5.1	Rezeptorinternalisierung .....	75
3.5.2	Rezeptorrecycling .....	78
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
4.1	PROBLEMSTELLUNG UND EXPERIMENTELLER ANSATZ .....	81
4.1.1	Klonierungsstrategie und Sequenzanalyse .....	81
4.1.2	Expression in eukaryontischen Zellen .....	83
4.1.3	Nachweismethoden .....	84
4.1.4	Funktionelle Untersuchung von Chemokinrezeptoren .....	85
4.2	AUSBLICK UND WEITERFÜHRENDE ARBEITEN .....	87
4.2.1	Chemokinrezeptoren als neue therapeutische Ziele .....	87
4.2.2	Die Maus als Modell für das humane Immunsystem .....	87
4.2.3	Weiterführende Arbeiten .....	88
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
	LITERATURVERZEICHNIS .....	i-xxv
	ANHANG	
	CHEMOKIN-AKRONYME, ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE .....	I-V
	DANKSAGUNG .....	
	LEBENS LAUF .....	

---

### **Anmerkung zur verwendeten Nomenklatur für Chemokine und Chemokinrezeptoren:**

Für die meisten *humanen* Chemokine haben sich nach ihrer Entdeckung und Charakterisierung Akronyme mit Bezug auf Funktion oder Zielzelle etabliert. Aufgrund einer nahezu unüberschaubaren Zahl unterschiedlicher Bezeichnungen wurde eine systematische Chemokin-Nomenklatur eingeführt. Die *humanen* Chemokinrezeptoren werden entsprechend des Cystein-Motivs ihrer Liganden als *CR*, *CCR*, *CXCR* oder *CX3CR* eingeteilt. Die *murinen* Chemokine und Chemokinrezeptoren wurden in der Vergangenheit meist mit einem kleinen *m* kenntlich gemacht (z.B. *mMCP-1* oder *mCCR2*). Die in dieser Arbeit verwendeten *murinen* Reagenzien und generierten Materialien wurden deshalb mit einem kleinen *m* bezeichnet. Nach der aktuellsten Nomenklatur-Empfehlung werden die *murinen* Chemokine und Chemokinrezeptoren nun mit Kleinbuchstaben entsprechend der systematischen Nomenklatur gekennzeichnet (z.B. *Ccl2* für *mMCP-1* oder *Ccr2* für *mCCR2*). In der vorliegenden Arbeit wurde soweit möglich die aktuellste Nomenklatur verwendet. Viele Akronyme wurden aber aufgrund ihrer Geläufigkeit zum besseren Verständnis beibehalten und an den systematischen Namen mit Schrägstrich angehängt (z.B. *CCL5/RANTES*).

# 1 Einleitung und Literaturübersicht

Die „Chemokine“ nehmen seit ihrer Entdeckung und Charakterisierung als „chemotaktische Zytokine“ eine Schlüsselrolle in unserem Verständnis von Leukozytenmigration, Immunregulation und Entzündung ein (Thelen 2001; Charo und Ransohoff 2006). Das folgende Kapitel versucht anhand der aktuellen Literatur die wichtigsten Grundlagen für das Verständnis der Chemokine sowie der Chemokinrezeptoren im Allgemeinen und der Chemokinrezeptoren CCR2 bzw. Ccr2 und CCR5 bzw. Ccr5 im Speziellen zu vermitteln.

## 1.1 DIE ENTDECKUNG DER CHEMOKINE UND IHRER REZEPTOREN

Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben August Waller (1846) und Julius Cohnheim (1867) das Phänomen der gerichteten, transendothelialen Leukozyten-Emigration und -Akkumulation im Rahmen entzündlicher Prozesse. Wenige Jahre später zeigte Ilja Metchnikoff (1891), dass Leukozyten Bakterien phagozytieren können und postulierte die Existenz von zellspezifischen, chemotaktischen Signalstoffen, die phagozytische Zellen an den Ort einer Infektion locken. Erst Mitte des 20. Jahrhunderts gelang die quantitative Untersuchung der Leukozyten-Migration entlang von löslichen Konzentrationsgradienten unter Verwendung einer Migrationskammer (Boyden 1962; Zigmond und Hirsch 1973). So konnte der Nachweis chemotaktischer Aktivität für C5a (Snyderman et al. 1969), für bakterielle N-Formyl-Oligopeptide (Schiffmann et al. 1975), für PAF (*platelet activating factor*) (Czarnetzki und Benveniste 1981) und für Leukotrien B<sub>4</sub> (Ford-Hutchinson et al. 1980) geführt werden. Für alle diese sehr unterschiedlichen chemotaktischen Stoffe fanden sich spezifische Oberflächenrezeptoren, die alle der großen Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit 7 Transmembran-Domänen angehören (Snyderman und Pike 1984). Parallel zu der Entdeckung dieser „klassischen“ chemotaktischen Faktoren fand man eine Reihe von sezernierten Signal-Polypeptiden, die Einfluss auf Aktivierung, Proliferation und Differenzierung verschiedenster Zellen hatten. Sie stellten sich als eine heterogene Gruppe von löslichen Mediatoren heraus, die unter anderem die Induktion und Regulation von Immunantworten koordinierten und unter dem Namen „Zytokine“ zusammengefasst wurden (Cohen et al. 1974; Thomson 1994). Hierzu zählen die Interferone (Isaacs und Lindenmann 1957; Green et al. 1969), die hämatopoetischen *colony stimulating factors*, die *growth factors*, die Lymphokine (Bloom und Bennett 1966; Dumonde et al. 1969) und die Monokine (Gery et al. 1971; Carswell et al. 1975). Die teils pleiotropen Funktionen der einzelnen Lympho- und Monokine führten zu unterschiedlichen Namen für identische Peptide, so dass man sich 1978 auf eine neue systematische „Interleukin“-Nomenklatur, beziehend auf ihre Eigenschaft als Mediatoren zwischen Leukozyten, einigte (Aarden et al. 1979). Als erstes Interleukin erhielt das als „*endogenous pyrogen* (EP)“, „*lymphocyte activating factor* (LAF)“ oder „*leucocyte endogenous mediator* (LEM)“ bekannte Zytokin den Namen „Interleukin-1 (IL-1)“ (Mizel



und Farrar 1979; Dinarello 1984). Bis 1988 waren die Interleukine IL-1 bis IL-7 charakterisiert worden (Arai et al. 1990).

Zu einem Wendepunkt im Verständnis der Entzündungsbiologie kam es, nachdem mehrere Arbeitsgruppen 1986/87 ein bisher unbekanntes, von Monozyten sezerniertes chemotaktisches Polypeptid, das sie „*monocyte-derived neutrophil chemotactic factor* (MDNCF)“ oder „*neutrophil-activating peptide* (NAP)“ nannten, beschrieben (Kownatzki et al. 1986; Schroeder et al. 1987; Walz et al. 1987; Yoshimura et al. 1987). 1988 gelang die Klonierung und Sequenzierung dieses, später IL-8 getauften, ersten chemotaktischen Zytokins (Matsushima et al. 1988). In der Folge führten Sequenzvergleiche und Hybridisierungsmethoden zu einer raschen Identifizierung weiterer Mitglieder dieser neuen Genfamilie (Wolpe und Cerami 1989), die anfänglich „*platelet factor-4 family*“ (Stoeckle und Barker 1990), „*small inducible secreted cytokines*“ (Schall 1991) oder „*intercrines*“ (Oppenheim et al. 1991) genannt wurde. Hierzu gehörten PF-4 (Deuel et al. 1977), IP-10 (Luster et al. 1985), JE/MCP-1 (Cochran et al. 1983; Rollins et al. 1988; Yoshimura et al. 1989), RANTES (Schall et al. 1988) und MIP (Davatelis et al. 1988). 1992 einigte man sich auf dem „*3. International Symposium on Chemotactic Cytokines*“ darauf, diese Familie chemotaktischer Zytokine in Zukunft „**Chemokine**“ zu nennen (Miller und Krangel 1992; Lindley et al. 1993; Taub und Oppenheim 1993).

Chemokine vermitteln ihre biologische Wirkung über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren. Der erste Nachweis spezifischer, hochaffiner Bindungsstellen konnte für IL-8 auf Neutrophilen (Samanta et al. 1989) und für MCP-1 (Yoshimura und Leonard 1990) und MIP-1 $\alpha/\beta$  (Wang et al. 1993) auf Monozyten erbracht werden. Wenig später gelang die Klonierung der IL-8-Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 (Holmes et al. 1991; Murphy und Tiffany 1991) sowie des MIP-1 $\alpha$ /RANTES-Rezeptors CCR1 (Gao et al. 1993; Neote et al. 1993). Sequenzanalysen zeigten, dass die Chemokinrezeptoren ebenfalls zu den G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptoren gehören (Horuk 1994).



Tab. 1-1 Klassifikation humaner Chemokine (Zlotnik und Yoshie 2000; Zlotnik et al. 2006)

systematische Bezeichnung	alternativer Name	produzierende Zellen/ exprimierendes Gewebe	primäre Zielzellen	Rezeptor	Chromosom	
<b>CXC (α)</b>						
		ELR				
CXCL1	GRO-α	+	M, Epi, En	N, L, M, En	CXCR1,2	4q13
CXCL2	GRO-β	+	M, Epi, En	N, L, M, En	CXCR2	4q13
CXCL3	GRO-γ	+	M, Epi, En	N, L, M, En	CXCR2	4q13
CXCL4	PF-4		P	F, En	?	4q13
CXCL5	ENA-78	+	M, N, Epi	N	CXCR2	4q13
CXCL6	GCP-2	+	M, Fib / Herz, Lunge, Niere	N	CXCR1,2	4q13
CXCL7	NAP-2	+	P, M, N	N	CXCR1,2	4q13
CXCL8	IL-8	+	M, L, N, Fib, Epi	N, T, En	CXCR1,2	4q13
CXCL9	Mig		M, Fib, Hep, IFN-γ-Z / Milz, Leber	T, NK	CXCR3	4q21
CXCL10	IP-10		M, IFN-γ-Z / LK, Thymus	T, NK	CXCR3	4q21
CXCL11	I-TAC		M, IFN-γ-Z / Milz, Pankreas	T	CXCR3,7	4q21
CXCL12	* SDF-1		Fib / Milz, KM, Darm	T, B, DZ, non-H	CXCR4,7	10q11
CXCL13	* BCA-1		DZ, En / Milz, LK, PeyerPI	B	CXCR5	4q21
CXCL14	BRAK		ubiquitär	M, DZ	?	5q31
CXCL16	SR-PSOX		DZ / LK, Milz, Lunge	T <sub>H1</sub> , T <sub>C1</sub> , NK, DZ	CXCR6	17p13
CXCL17	DMC		Magen, Trachea	D, M	?	19q13
<b>CC (β)</b>						
CCL1	I-309		M, T	M, Thy, T <sub>H2</sub>	CCR8	17q11
CCL2	MCP-1		M, Fib, En	M, T, Ba, Fib	CCR2	17q11
CCL3	MIP-1α		M, T, NK, N, DZ, Fib, En, Mes	M, T, DZ	CCR1,5	17q11
CCL4	MIP-1β		M, T, NK, N, DZ, Fib, En	M, DZ	CCR5	17q12
CCL5	RANTES		M, T, Fib, Epi, En, P, Eos	M, T, DZ, Eo, Ba	CCR1,3,5	17q12
CCL7	MCP-3		M, Fib, P	M, T, NK, DZ, Eo, Ba	CCR1,2,3,5	17q11
CCL8	MCP-2		N, Fib	M, T, NK, Eo, Ba	CCR1,2,3,5	17q11
CCL11	Eotaxin-1		M, Eos, Fib, resp.Epith, Endo	Eo, Ba, T <sub>H2</sub>	CCR(2),3,5	17q11
CCL13	MCP-4		M, L, En, Epi / Lunge, Darm	M, T, DZ, Eo, Ba	CCR1,2,3,5	17q11
CCL14	HCC-1		Milz, Darm, Leber, Muskel	M, StZ	CCR1	17q12
CCL15	HCC-2		L, NK, M, DZ / Leber, Darm	T, M, Eo	CCR1,3	17q12
CCL16	LEC		(M) / Leber	M, L	CCR1,2	17q12
CCL17	* TARC		T, DZ, Thy / Thymus, Lunge, Darm	Thy, T <sub>H2</sub>	CCR4	16q13
CCL18	* PARC		M, DZ / Lunge, LK, Thymus	T	?	17q12
CCL19	* ELC		DZ / Thymus, LK	T, B, DZ, Thy	CCR7	9p13
CCL20	* LARC		Epi, M, DZ, T / LK, MALT, Lunge	T, DZ	CCR6	2q36
CCL21	* SLC		En / Thy, Milz, LK, MALT	T, B, DZ, Thy	CCR7	9p13
CCL22	* MDC		M, DZ, Thy / Thymus, LK, Darm	T <sub>H2</sub> , Thy, NK, DZ	CCR4	16q13
CCL23	MPIF-1		DZ / Pankreas, Muskel	M, L, StZ	CCR1	17q12
CCL24	Eotaxin-2		M / Lunge, Haut	Eo, Ba, T <sub>H2</sub>	CCR3	7q11
CCL25	* TECK		Epi, DZ / Thymus, Leber, Darm	Thy, T, M, DZ	CCR9	19p13
CCL26	Eotaxin-3		Fib, En / Haut, Herz, Ovar	Eo, Ba	CCR3	7q11
CCL27	* CTACK		Epi / Haut, Plazenta	T, Fib, Endo	CCR10	9p13
CCL28	* MEC		Epi / Brust, Speicheldrüse, Kolon	T, Eo	CCR3,10	5p12
<b>C (γ)</b>						
XCL1	Lymphotactin		T / Thymus, Milz	T, NK	XCR1	1q24
XCL2	SCM-1β		T	L	XCR1	1q24
<b>CXXXC (δ)</b>						
CX3CL1	Fractalkine		En / Gehirn, Lunge, Herz	M, T, NK	CX3CR1	16q13

\* : „nicht-entzündliche, homöostatische“ Chemokine; „+“: CXC-Chemokine mit ELR-Motiv

Cxcl15 (Lungkine), Ccl16 (MRP-1), Ccl9/Ccl10 (MRP-2) und Ccl12 (MCP-5) sind bisher nur in der Maus identifiziert worden.

**Abkürzungen:** B: B-Lymphozyten; Ba: Basophile; DZ: Dendritische Zellen; Eo: Eosinophile; En: Endothelzellen, Epi: Epithelzellen; Fib: Fibroblasten; Hep: Hepatozyten; IFN-γ-Z: Interferon-γ-stimulierte Zellen; L: Lymphozyten; M: Monozyten/Makrophagen; N: Neutrophile; NK: Natürliche Killer Zellen; StZ: Stammzellen; T: T-Lymphozyten, T<sub>C1</sub>: Typ 1 Killer-T-Zellen, T<sub>H1</sub>: Typ 1 Helfer-T-Zellen; T<sub>H2</sub>: Typ 2 Helfer-T-Zellen; Thy: Thymozyten. (Chemokin-Akronyme im Anhang).

Die Chemokine werden lokal von intrinsischen oder infiltrierten Zellen sezerniert und binden an Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix und des Endothels (Tanaka et al. 1993). Hierdurch kann ein lokaler Chemokin-Konzentrationsgradient über mehrere Stunden aufrecht erhalten werden, der neben einer *chemotaktischen* Zellmigration (Wanderung entlang eines *löslichen* Gradienten) auch eine *haptotaktische* Zellmigration (Wanderung entlang eines *gebundenen* Gradienten) ermöglicht (Springer 1994; Proudfoot et al. 2003).

Entsprechend ihrer physiologischen Rolle können die Chemokine funktionell in inflammatorische oder nicht-inflammatorische Chemokine eingeteilt werden:

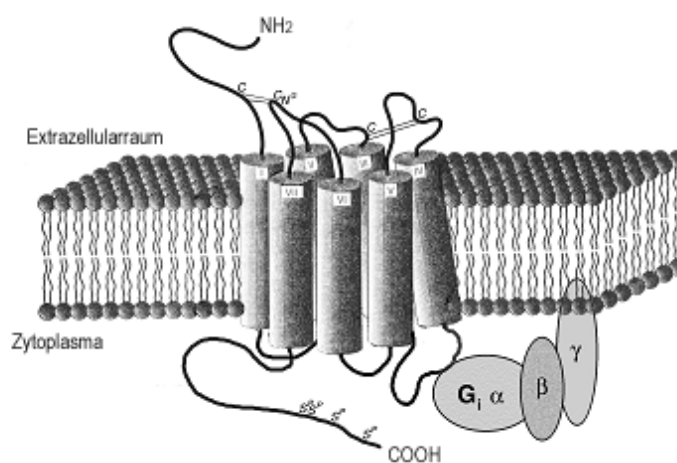
„Inflammatorische“, induzierbare Chemokine können in den meisten Geweben im Rahmen der Immunantwort auf inflammatorische Stimuli (proinflammatorische Zytokine, bakterielle Toxine oder lokale Entzündungsmediatoren) produziert werden. Sie sind maßgeblich für die Rekrutierung spezifischer Leukozyten-Subpopulationen (wie z.B. Neutrophile, Monozyten, Basophile, Eosinophile, Effektor-T-Zellen, Dendritische Zellen) an den Ort einer Entzündung verantwortlich. In aktivierten Zellen werden die Gene schnell über Transkriptionsfaktoren sowie eine mRNA-Stabilisierung hochreguliert oder teilweise sogar präformiert sezerniert (Yasumoto et al. 1992; Ueda et al. 1994). Die große Zahl zum Teil sehr ähnlicher inflammatorischer Chemokine ermöglicht eine komplexe, hoch differenzierte Regulation der zellulären Immunantwort (Mackay 2001). Eine Grundlage für diese Vielfalt sind die im Laufe der Evolution aufgetretenen multiplen Genduplikationen, die zu vier großen Gen-*Clusters* für inflammatorische Chemokine geführt haben (Zlotnik et al. 2006). Die vielen Mitglieder eines *Clusters* zeigen eine hohe strukturelle Homologie, besitzen eine ähnliche Funktion und teilen sich meist mehrere Rezeptoren. Es sind dies der *MCP-Cluster* und der *MIP-Cluster* auf Chromosom 17q11-17q12, der *GRO-Cluster* auf Chromosom 4q13.3 und der *IP-10-Cluster* auf Chromosom 4q21.1 (Nomiyama et al. 1999). Die *non-cluster* oder *mini-cluster* Chemokine, zu denen die meisten homöostatischen Chemokine gehören, unterscheiden sich mehr in Struktur und Funktion und benutzen meist nur einen Rezeptor (Zlotnik et al. 2006).

„Nicht-inflammatorische“, homöostatische Chemokine (in Tab. 1-1 mit einem Stern gekennzeichnet) werden v.a. konstitutionell in den primären und sekundären lymphatischen Geweben exprimiert und koordinieren die Migration und Lokalisation von T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen im Rahmen ihrer physiologischen Reifung, der Immunüberwachung und der adaptiven Immunantwort (Baggiolini und Loetscher 2000; Yoshie et al. 2001).

### 1.2.2 Struktur und Klassifikation der Chemokinrezeptoren

Die Chemokinrezeptoren besitzen als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen einen extrazellulären NH<sub>2</sub>-Terminus, einen intrazellulären COOH-Terminus und sind mit sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert. Disulfidbrücken zwischen konservierten, extrazellulären Cysteinresten stabilisieren die Tertiärstruktur. Teile des NH<sub>2</sub>-Terminus und der extrazellulären Schleifen bilden die Liganden-Bindungstasche. Teile des COOH-Terminus und der intrazellulären Schleifen vermitteln die Ankopplung an G-Proteine und andere Signaltransduktionsmoleküle.

A



B

1 - NH<sub>2</sub>-Terminus - 31 TM I 58 i1 69  
 MDYQVSSPIY DINYYTSEPC QKINVKQIAA RLLPPLYSLV FIFGFVGNML VILILINCKR LKSMTDIY LL  
 ... TM II 89 e1 103 TM III 124 i2  
 NLAISDLFFL LTPVFWAHY A AAQWDFGNTM CQ LLTGLYFI GFSGIFFII LLTI DRYLAV VHAVFALKAR  
 141 TM IV 166 e2 199 TM V  
 T VTFGVVTSV ITWVVAVFAS LPGIIF TRSQ KEGLHYTC SS HFPYSQYQFW KNFQTLKI VI LGLVLPPLVM  
 218 i3 236 TM VI 258 e3 278  
 VICYSGIL KT LLRCRNEKKR HRAVR LIFTI MIVYFLFWAP YNIVLLLN TF QEFFGLNNC S SSNRLDQ AMQ  
 TM VII 301 - COOH-Terminus - 352  
 VTETLGMTHC CINPIIYAFV G EKFRNYLLV FFQKHIAKRF CKCCSIFQQE APERAPSVYT RSTGEQEISV GL

#### Abb. 1-2 Schematische Darstellung von CCR5

(Modifizierung eines Modells von Burgstahler 1997, nach Baldwin 1993, Schall et al. 1995 und Palczewski et al. 2000)

A: Modell der dreidimensionalen Struktur eines in die Zellmembran eingebauten Chemokinrezeptors

B: Aminosäuresequenz des humanen Chemokinrezeptors CCR5 (*Swissprot* P51681) mit Markierung der sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen (TM I-VII), Disulfidbrücken zwischen den extrazellulären Cysteinresten (C20/C269 und C101/C178), extrazellulären (e1-3) und intrazellulären Schleifen (i1-3).

Die bis dato ca. 20 charakterisierten humanen Chemokinrezeptoren haben eine Länge von 340-370 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ca. 40kDa. Seit der „*Gordon Research Conference on Chemotactic Cytokines, 1996*“ werden sie, entsprechend der Untergruppenzugehörigkeit ihrer Liganden, in CXC-, CC-, XC- und CX<sub>3</sub>C-Motiv Chemokinrezeptoren eingeteilt.

**Tab. 1-2 Klassifikation der humanen Chemokinrezeptoren** (Murphy et al. 2000; Charo und Ransohoff 2006)

Rezeptor	exprimierende Zellen	Liganden	Chromosom
<b>CXC-Chemokinrezeptor</b>			
CXCR1	N	CXCL6/GCP-2, CXCL8/IL-8	2q34
CXCR2	N, En	CXCL1/GRO- $\alpha$ , CXCL2/GRO- $\beta$ , CXCL3/GRO- $\gamma$ , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8	2q34
CXCR3	T <sub>H1</sub>	CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CXCL 11/I-TAC	Xq13
CXCR4	ubiquitär	CXCL12/SDF-1	2q21
CXCR5	B, T	CXCL13/BCA-1	11q23
CXCR6	T <sub>H1</sub> , T <sub>c1</sub> , NK	CXCL16/SR-PSOX	3p21
CXCR7		CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1	2q37
<b>CC-Chemokinrezeptor</b>			
CCR1	M, T, Eo, Ba	CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL16/LEC, CCL23/MPIF-1	3p21
CCR2	M, T <sub>H1</sub> , DZ, NK, Ba, Fib	CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL13/MCP-4	3p21
CCR3	Eo, Ba, T <sub>H2</sub> , P	CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL15/HCC-2, CCL24/Eotaxin-2, CCL26/Eotaxin-3	3p21
CCR4	M, T <sub>H2</sub> , DZ, Ba	CCL17/TARC, CCL22/MDC	3p24
CCR5	M, T <sub>H1</sub> , T <sub>c1</sub> , NK	CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2	3p21
CCR6	T, B, DZ	CCL20/LARC	6q27
CCR7	T, DZ	CCL19/ELC, CCL21/SLC	17q12
CCR8	T <sub>H2</sub> , M, NK, DZ	CCL11/I-309	3p21
CCR9	T, IgA-Pla	CCL25/TECK	3p21
CCR10	T	CCL27/CTACK, CCL28/MEC	17q21
<b>C-Chemokin-Rezeptor</b>			
XCR1	T, NK, P, Thy	XCL1/Lymphotactin, XCL2/SCM-1 $\beta$	3p21
<b>CX<sub>3</sub>C-Chemokin-Rezeptor</b>			
CX <sub>3</sub> CR1	T, NK, M, En	CX <sub>3</sub> CL1/Fractalkine	3p21

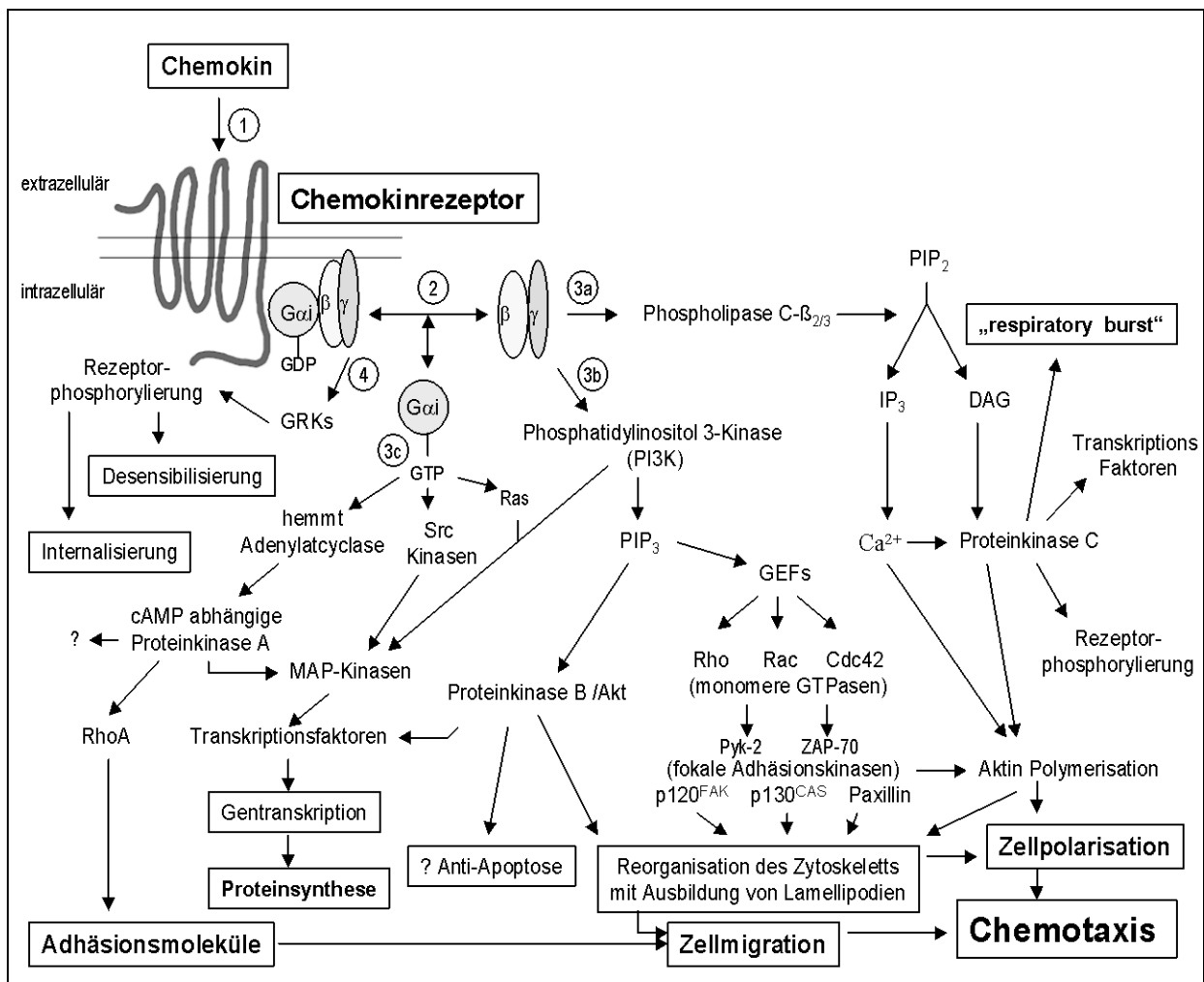
Die 7-Transmembran-Proteine Duffy und D6 binden eine Reihe von Chemokinen, ohne eine Signaltransduktion auszulösen.

Chemokinbindende 7-TM-Proteine	(Liganden ohne Signaltransduktion)	
Duffy	Ery, En	(CXCL1/GRO- $\alpha$ , CXCL5/ENA-78, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3)
D6	Plazenta	(CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1)

**Abkürzungen:** B: B-Lymphozyten; Ba: Basophile; DZ: Dendritische Zellen; Eo: Eosinophile; En: Endothelzellen, Epi: Epithelzellen; Ery: Erythrozyten; Fib: Fibroblasten; Hep: Hepatozyten; IFN- $\gamma$ -Z: Interferon- $\gamma$ -stimulierte Zellen; IgA-Pla: IgA<sup>+</sup> Plasmazellen; L: Lymphozyten; M: Monozyten/Makrophagen; N: Neutrophile; NK: Natürliche Killerzellen; P: Thrombozyten; StZ: Stammzellen; T: T-Lymphozyten, T<sub>c1</sub>: Typ 1 Killer-T-Zellen, T<sub>H1</sub>: Typ 1 Helfer-T-Zellen; T<sub>H2</sub>: Typ 2 Helfer-T-Zellen; Thy: Thymozyten. (Chemokin-Akronyme im Anhang).

### 1.2.3 Chemokinrezeptor-assoziierte Signaltransduktion

Die spezifische zelluläre Antwort auf ein Chemokin ist unter anderem abhängig von Zelltyp, Rezeptorexpression, G-Protein-Kopplung und zellspezifischen *second messenger* Systemen (Thelen und Stein 2008). Die Bindung zwischen Chemokin und Chemokinrezeptor führt zu einer Konformationsänderung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, wodurch intrazellulär der Austausch von GDP zu GTP an der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit vermittelt wird. Durch diese Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins wird eine komplexe Kaskade intrazellulärer Reaktionen ausgelöst. Die Haupteffektorfunktion von  $G_{\alpha i}$  ist die Hemmung der intrazellulären Adenylatcyclase mit Senkung des cAMP-Spiegels und Modulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase A. Die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aktiviert die membranständige Phospholipase C, die Phosphatidylinositol-Biphosphat in Inositol-Triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) spaltet.  $IP_3$  vermittelt die Freisetzung von Calcium, welches über einen Calcium-Calmodulin-Komplex eine Vielzahl von Enzymen aktiviert. DAG aktiviert zusammen mit Calcium die Proteinkinase C, die an der Aktinpolymerisation, dem *respiratory burst* und der Rezeptor-phosphorylierung beteiligt ist. Ein weiterer wichtiger Signaltransduktionsweg läuft über eine  $G_{\beta\gamma}$ -aktivierte Phosphatidylinositol-3-Kinase, die Phosphoinositole zu Phosphatidylinositol-Triphosphat ( $PIP_3$ ) phosphoryliert.  $PIP_3$  rekrutiert unter anderem *GTP-exchange factors*, die kleine GTPasen wie RhoA, Cdc42 und Rac aktivieren. Diese können über fokale Adhäsions-kinasen die Reorganisation des Zytoskeletts und die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien induzieren und Einfluss auf die Zellpolarisation nehmen.  $PIP_3$  aktiviert auch die Proteinkinase B (PKB) und MAP-Kinasen, die an der Aktivierung von mehreren Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa$ B, STAT-1, STAT-3 und AP-1 beteiligt sind. Zudem vermutet man eine Rolle der PKB in der Reorganisation des Zytoskeletts sowie dem Zellüberleben. Als Kontrollmechanismen zur Beendigung der Signaltransduktion wirken eine autokatalytische GTPase-Einheit von  $G_{\alpha}$  sowie die Rezeptorphosphorylierung mit anschließender Desensibilisierung und  $\beta$ -Arrestin vermittelter Rezeptorinternalisierung (Ben-Baruch et al. 1995; Maghazachi 1999; Loetscher et al. 2000; Maghazachi 2000; Thelen 2001). Für manche Chemokinrezeptoren, so auch für CCR2 und CCR5, wird zudem eine G-Protein-unabhängige Aktivierung des Tyrosinkinase-Signalweges, wie der Janus-Kinase (Jak/STAT) über eine Rezeptor-Dimerisierung vermutet (Rodriguez-Frade et al. 1999; Mellado et al. 2001; Mellado et al. 2001; Thelen und Baggiolini 2001).



**Abb. 1-3 Chemokinrezeptor-assoziierte Signaltransduktionswege**  
(Schema erstellt nach Maghazachi 2000 und Thelen 2001)

- (1) Die Chemokinbindung führt über eine Konformationsänderung des Chemokinrezeptors und nachgeschalteten *second messenger* Kaskaden zu Chemotaxis und Zellaktivierung.
- (2) Dissoziation des Rezeptor-gekoppelten G-Proteins in die  $G_{\alpha}$ -GTP- und  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten
- (3) a) Die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aktiviert die membranständige Phospholipase C, die Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP<sub>3</sub> vermittelt die Freisetzung von Calcium (Ca<sup>2+</sup>). DAG aktiviert zusammen mit Calcium die Proteinkinase C, die an der Aktinpolymerisation, dem *respiratory burst*, der Rezeptorphosphorylierung und an der Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt ist.  
 b) Die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aktiviert auch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), die Phosphoinositole zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert. PIP<sub>3</sub> rekrutiert unter anderem *GTP-exchange factors* (GEFs), die kleine GTPasen wie RhoA, Cdc42 und Rac aktivieren. Diese können über fokale Adhäsionskinasen die Reorganisation des Zytoskeletts und die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien induzieren und Einfluss auf die Zellpolarisation nehmen. Eine weitere über PIP<sub>3</sub> induzierte Signaltransduktionskaskade läuft über die Proteinkinase B, die an der Aktivierung von mehreren Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. Zudem vermutet man eine Rolle in der Reorganisation des Zytoskeletts und dem Zellüberleben (Anti-Apoptose). PI3K aktiviert auch MAP-Kinasen, die ebenfalls verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren.
- c) Die Haupteffektorfunktion von  $G_{\alpha}$  ist die Hemmung der Adenylatcyclase mit Senkung des cAMP-Spiegels und Modulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase A. Ein Effektor ist die RhoA-GTPase, die beteiligt ist an der Aktivierung von spezifischen Adhäsionsmolekülen.
- (4) Als Kontrollmechanismen zur Beendigung der Signaltransduktion wirken eine autokatalytische GTPase Einheit von  $G_{\alpha}$  sowie eine Rezeptorphosphorylierung via GRKs (*G-protein coupled receptor kinases*) mit anschließender Desensibilisierung und  $\beta$ -Arrestin vermittelter Rezeptorinternalisierung.



### 1.2.4 Chemokinrezeptoren und Leukozytenmigration

Chemokinrezeptoren (CKR) vermitteln die gerichtete Wanderung von Leukozyten entlang Chemokin-Gradienten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zirkulation von Lymphozyten im Rahmen von physiologischer Reifung, Differenzierung und Immunantwort (Yoshie et al. 2001). Sie koordinieren auch die spezifische Leukozytenmigration und -akkumulation im Rahmen von Infektabwehr und Entzündung (Adams und Lloyd 1997).

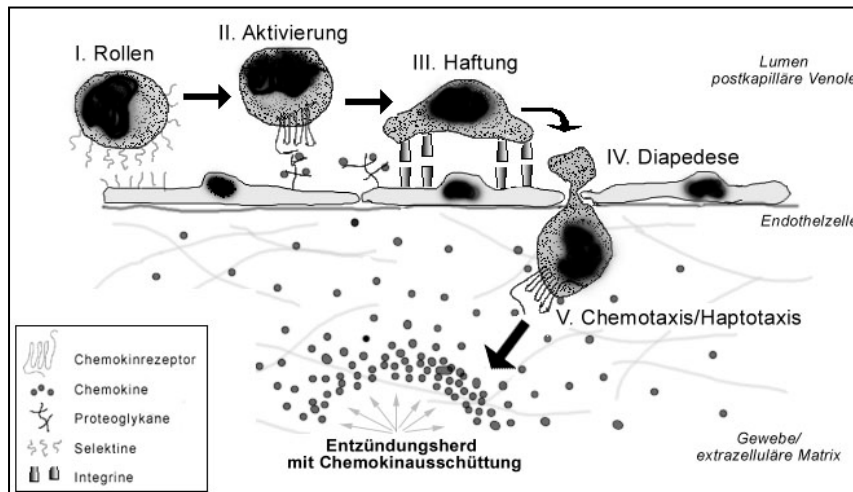
#### Reifung und funktionelle Differenzierung von Lymphozyten

Nach ihrer Ausreifung verlassen die myelopoetischen Zellreihen (Granulozyten, Monozyten, Dendritische Zellen) das Knochenmark und zirkulieren systemisch mit einem charakteristischen, primär auf Entzündungsreize spezialisierten CKR-Expressionsprofil. Die lymphatischen B- und T- Zellreihen hingegen durchlaufen einen weiteren Reifungs- und Selektionsprozess in den primär lymphatischen Organen. Dieser wird vermutlich via kompartiment-spezifischen, *homöostatischen* Chemokinen und einer differentiellen CKR-Expression feinreguliert (Loetscher et al. 2000; Yoneyama et al. 2000; Luther und Cyster 2001). So konnte gezeigt werden, dass sich Effektor-T-Zellen mit unterschiedlicher Gewebespezifität (z.B. Haut oder MALT) im CKR-Profil unterscheiden (Kunkel und Butcher 2002). Auch die funktionelle Polarisierung in T<sub>H</sub>1-Zellen (charakterisiert durch eine IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion) ist z.B. durch eine Hochregulierung von CXCR3 und CCR5 gekennzeichnet (Qin et al. 1998). Im Gegensatz hierzu exprimieren T<sub>H</sub>2-Zellen (charakterisiert durch eine IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Produktion) vor allem CCR4, CCR8 und zum Teil CCR3 (Sallusto et al. 1998; Zingoni et al. 1998).

#### Chemotaxis und Leukozytendiapedese

Die zirkulatorischen und migratorischen Eigenschaften der Leukozyten erlauben die kontinuierliche Überwachung des Gewebes auf infektiöse Pathogene und die rasche Akkumulation an Orten von Infektion oder Verletzung. Voraussetzung hierfür ist eine feinabgestimmte Interaktion zwischen Leukozyten, Endothel und Zellmatrix, an der Chemokine und CKR wesentlich beteiligt sind. Die hochdifferenzierte Steuerung der Leukozytenwanderung und Diapedese kann modellhaft in mehrere Schritte unterteilt werden. Voraussetzung für den streng regulierten Gefäßaustritt ist das Rollen der Leukozyten in den postkapillären Venolen. Dieses Phänomen beruht einerseits auf der venös deutlich verlangsamten Flussgeschwindigkeit und andererseits auf der Interaktion von spezifischen, durch Entzündungsmediatoren hochregulierten, niedrig-affinen Adhäsionsmolekülen, den Selektinen (wie CD62-E, -P und -L) und ihren Kohlenhydrat-Liganden (wie GlyCAM-1, PSGL-1, ESL-1, CD34). Ebenso kommt es auf Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von Proteoglykanen, die Chemokine binden und diese den langsam rollenden Leukozyten präsentieren. Chemokinrezeptoren vermitteln daraufhin eine rasche Leukozyten-Aktivierung mit einer Expression von spezifischen, induzierbaren Adhäsionsmolekülen, den Integrinen (wie  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, LFA-1, VLA-4). Über eine Bindung an ICAMs (*intercellular adhesion*

*molecules*) und *VCAMs* (*vascular cell adhesion molecules*), die wiederum in entzündetem Gewebe durch proinflammatorische Zytokine (wie IL-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) hochreguliert werden, kommt es zur festen Haftung der Leukozyten an das Endothel. Die Chemokinbindung und die Leukozyten-Aktivierung lösen eine Reorganisation des Leukozyten-Zytoskeletts aus, welches zur Zellpolarisation, Diapedese und Gewebeinfiltration der aktivierten Leukozyten entlang des Chemokin-Gradienten führt.



**Abb. 1-4 Leukozytendiapedese aus postkapillären Venolen bei Entzündung**

(Abbildung adaptiert nach Springer 1994, Luster 1998 und von Andrian und Mackay 2000)

Das **Rollen (I.)** der Leukozyten in den postkapillären Venolen wird über Selektine und ihre Kohlenhydrat-Liganden vermittelt. Endothelzellen präsentieren diesen Leukozyten Chemokine, die an Proteoglykane gebunden sind. Chemokinrezeptoren vermitteln daraufhin eine rasche **Leukozyten-Aktivierung (II.)** mit einer Expression von Integrinen. Über eine Bindung an ICAMs (*intercellular adhesion molecules*) und VCAMs (*vascular cell adhesion molecules*) kommt es zur festen **Haftung (III.)** der Leukozyten an das Endothel. Die Chemokinbindung löst eine Reorganisation des Leukozyten-Zytoskeletts aus, welches zur Zellpolarisation, **Diapedese (IV.)** und Gewebeinfiltration der aktivierten Leukozyten entlang des Chemokin-Gradienten (**V. Chemotaxis/Haptotaxis**) führt.

### Chemokinrezeptoren und Immunantwort

Nahezu alle Körperzellen sind in der Lage, inflammatorische Chemokine zu produzieren. Unterschiedliche pathogene Stimuli lösen spezifische Zytokin-Kaskaden aus, die wiederum die Sekretion von Chemokinen und damit die Einwanderung von synergistischen Leukozyten-Subpopulationen kontrollieren (Roebuck et al. 1999). So ist die akute Entzündung meist durch die frühe Akkumulation von CXC-Chemokinrezeptor-exprimierenden Neutrophilen und die spätere Infiltration von CC-Chemokinrezeptor-exprimierenden Monozyten gekennzeichnet. Bei allergischen oder Helminthen-bedingten Entzündungen kommt es zu einer CCR3-vermittelten Akkumulation von Eosinophilen (Murdoch und Finn 2000). Bei viralen Infektionen führt eine Aktivierung von Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T<sub>C</sub>1-Zellen zur Sekretion von CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  und CCL5/RANTES. Diese vermitteln eine Akkumulation von Monozyten über die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 (Price et al. 1999; Kaufmann et al. 2001). Lokale Verletzungen können u.a. über die Generation von

Sauerstoffradikalen eine Expression von inflammatorischen Chemokinen auslösen (Satriano et al. 1993; Furie und Randolph 1995; Li et al. 2001). Einzelne Chemokine können auch eine direkte Leukozyten-Aktivierung auslösen. So führt z.B. CXCL8/IL-8 zur Degranulation von Neutrophilen mit Freisetzung von Lysozym, Kollagenase und Elastase und z.B. CCL2/MCP-1 zur Ausschüttung von Histamin aus Basophilen (Baggiolini et al. 1989; Baggiolini und Dahinden 1994).

Auch die erworbene zelluläre Immunantwort wird über eine differentielle Chemokin/Chemokinrezeptor-Expression reguliert. In vielen Fällen ändern Immunzellen ihr Chemokinrezeptor-Expressionsprofil reife- und funktionsabhängig. So wandern z.B. unreife Dendritische Zellen (DZ) an Entzündungsorte über eine Expression von inflammatorischen Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR2 und CCR5 sowie Rezeptoren für PAF, fMLP und C5a (Sozzani et al. 1998; Allavena et al. 2000). Nach Antigenaufnahme und unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine beginnen DZ einen sequentiellen Reifungsprozess, in dessen Verlauf inflammatorische Chemokinrezeptoren herunterreguliert werden und der *homing*-Rezeptor für sekundär lymphatische Organe, CCR7, hochreguliert wird. Gleichzeitig werden vermehrt MHC-II-, Adhäsions- und kostimulierende Moleküle wie CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3 und CD80/B7 exprimiert (Caux et al. 2000). Als Folge hiervon wandern die Antigen-beladenen DZ in die parafollikulären T-Zellzonen sekundär lymphatischer Organe, in denen die CCR7-Liganden CCL19/ELC und CCL21/SLC konstitutiv exprimiert werden (Yoshie 2000). Hier interagieren sie als reife Antigen-präsentierende Zellen mit naiven, ebenfalls CCR7-positiven T-Zellen. Nach Antigenkontakt proliferieren die Antigen-spezifischen T-Zellen und entwickeln sich zu reifen, nun CCR7-negativen Effektor/Gedächtnis-Zellen. Während dieser klonalen Expansion exprimieren sie vermehrt inflammatorische Chemokinrezeptoren, beginnen systemisch zu rezirkulieren und wandern entlang eines inflammatorischen Chemokin-Gradienten zum Entzündungsherd (Loetscher et al. 2000).

Obwohl die Infiltration und Aktivierung von Leukozyten an Orten von Infektion und Verletzung normaler Bestandteil der Immunabwehr sind, kann dies auch zu einer Gewebeschädigung führen (Strieter et al. 1996). Es hat sich gezeigt, dass Chemokine und Chemokinrezeptoren bei unterschiedlichen entzündlichen, infektiösen, allergischen und autoimmunen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Premack und Schall 1996; Luster 1998; Baggiolini 2001; Gerard und Rollins 2001).

Die beiden Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5, auf die sich die vorliegende Arbeit konzentriert, sind ganz wesentlich beteiligt an der Infiltration und Aktivierung von Monozyten und T-Zellen im Rahmen der zellulären Immunantwort sowie an chronischen Entzündungsprozessen. CCR5 ist als wichtigster HIV-Corezeptor zu einem Schlüsselmolekül in der HIV-Pathogenese geworden (Alkhatib und Berger 2007). In den folgenden Abschnitten wird speziell auf diese zwei nah verwandten Chemokinrezeptoren und ihre murinen Homologe Ccr2 und Ccr5 eingegangen.

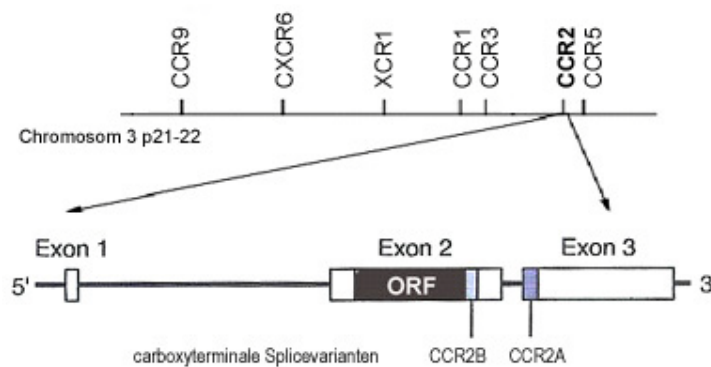
## 1.3 DER CHEMOKINREZEPTOR CCR2

### 1.3.1 Der humane Chemokinrezeptor CCR2

Anfang 1990 konnte in Bindungsstudien mit Iod-markiertem CCL2/MCP-1 ein spezifischer MCP-1-Rezeptor auf Monozyten nachgewiesen werden (Yoshimura und Leonard 1990). Zwei Arbeitsgruppen gelang 1994 unabhängig voneinander die Klonierung des MCP-1-Rezeptors CCR2. Die Arbeitsgruppe von I. Charo isolierte zwei Splicevarianten von CCR2 (*GenBank* U03882/ U03905) aus cDNA der humanen Monozyten-Linie *MonoMac6*. Sie wendeten eine PCR-Klonierungs-Strategie mit Primern für konservierte Sequenzabschnitte der zweiten und dritten Transmembran-Domäne der Chemokinrezeptoren CCR1 und CXCR1 an (Charo et al. 1994). S. Yamagami et al. isolierten CCR2 (*GenBank* D29984) aus einer cDNA-Bibliothek der humanen Monozytenzelllinie *THP-1*. Sie verwendeten eine Hybridisierungssonde, die sie aus cDNA von peripheren Monozyten mit Primern für konservierte Sequenzabschnitte der zweiten und siebten Transmembran-Domänen von CXCR1, des fMLP-Rezeptors und des C5a-Rezeptors gewonnen hatten (Yamagami et al. 1994).

#### Organisation des humanen CCR2-Gens

Das humane CCR2-Gen liegt zusammen mit den Genen für CCR1, CCR3, CCR5, CCR9 sowie CXCR6 und XCR1 in einem Cluster auf Chromosom 3p21-22 (Maho et al. 1999).



#### Abb. 1-5 Organisation des humanen CCR2-Gens

(Abbildung modifiziert nach Rodriguez-Frade et al. 2001; aktualisiert nach [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) 2008)

Das CCR2-Gen ist ca. 7kb lang und besteht aus drei Exons und zwei Introns. Es kodiert die zwei carboxyterminalen Splicevarianten CCR2A (374 Aminosäuren) und CCR2B (360 Aminosäuren; 41,9kDa Molekulargewicht). CCR2B stellt die vornehmlich auf der Zelloberfläche exprimierte Isoform dar und wird deshalb häufig allgemein als CCR2 bezeichnet (Rodriguez-Frade et al. 2001; Tanaka et al. 2002). Die gemeinsame 5'-UTR (*untranslated region*) von CCR2A und CCR2B wird durch ein ca. 3kb langes Intron

unterbrochen. Auf Exon 2 liegt die gesamte kodierende Sequenz (ORF: *open reading frame*) der gemeinsamen 7-Transmembran-Domäne sowie der C-Terminus (47 Aminosäuren) und die 3'-UTR von CCR2B. Intron 2 hat eine Länge von 260bp. Der C-Terminus (61 Aminosäuren) und die 3'-UTR der Splicevariante CCR2A liegt auf Exon 3. Es findet sich je ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) 20-45bp aufwärts von dem 3'-Ende von Exon 2 und 3. Der Promotor besitzt eine TATAA-Box (-31 bis -27) und eine CCAAT-Box (-128 bis -124) (Wong et al. 1997; Rodriguez-Frade et al. 2001).

#### Expression des humanen CCR2-Gens

CCR2 (*SwissProt* P41597) besitzt wie alle Chemokinrezeptoren sieben hydrophobe Transmembrandomänen, 3 intrazelluläre und 3 extrazelluläre Schleifen sowie einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus. Die Expression von CCR2 auf der Zelloberfläche ist abhängig von Zelltyp, Differenzierung und Aktivierung. Charakteristischerweise zeigen zirkulierende Monozyten ein hohes CCR2-Expressionsniveau (Sozzani et al. 1997; Fantuzzi et al. 1999). Auch unreife Dendritische Zellen (Sozzani et al. 1997), aktivierte T-Lymphozyten (Rabin et al. 1999) und Mastzellen exprimieren CCR2. Ebenso konnte für periphere B-Lymphozyten (Frade et al. 1997), Basophile (Uguccioni et al. 1997; Iikura et al. 2001), Eosinophile (Dunzendorfer et al. 2001), NK-Zellen (Polentarutti et al. 1997; Nieto et al. 1998), Fibrozyten (Moore et al. 2005), Epithelzellen und aktivierte Endothelzellen (Weber et al. 1999) eine CCR2-Expression nachgewiesen werden.

Die Expression von CCR2 ist in vielen Zellen induzierbar. IL-2 (Sozzani et al. 1997), IL-10 (Sozzani et al. 1998) wie auch Glukokortikoide (Penton-Rol et al. 1999) erhöhen die Oberflächenexpression von CCR2 auf Monozyten, NK-Zellen (Polentarutti et al. 1997) und T-Lymphozyten (Loetscher et al. 1996) über eine Verlängerung der mRNA-Halbwertszeit. LDL (Han et al. 1998) und Homocystein (Wang und O 2001) führen zu einer Erhöhung der CCR2-Expression auf Monozyten. Eine höhere CCR2-Expression führt zu einer deutlichen Zunahme der Migrationsaktivität von Leukozyten auf MCPs. Zirkulierende Monozyten wandern entlang MCP-Konzentrationsgradienten in Entzündungsherde ein und akkumulieren dort. Hier führen proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  oder mikrobielle Produkte wie LPS wiederum zu einer selektiven Hemmung der CCR2-Expression (Sica et al. 1997; Penton-Rol et al. 1998). Der beobachtete Effekt durch LPS beruht auf einer Verkürzung der mRNA-Halbwertszeit (Sozzani et al. 1997).

#### Liganden von CCR2

CCR2 bindet die inflammatorischen Chemokine CCL2/MCP-1 (Yoshimura et al. 1989), CCL8/MCP-2 (van Damme et al. 1992), CCL7/MCP-3 (van Damme et al. 1992), CCL13/MCP-4 (Garcia-Zepeda et al. 1996) und CCL16/LEC (Nomiyama et al. 2001). CCL2/MCP-1 bindet als einziger CCR2-Ligand selektiv nur CCR2. CCL8/MCP-2 bindet auch CCR1, CCR3 und CCR5. CCL7/MCP-3 und CCL13/MCP-4 binden auch CCR1 und CCR3. CCL16/LEC bindet ebenfalls CCR1, CCR5 und CCR8, wobei die physiologische Relevanz hierfür derzeit ungeklärt ist. Die Affinität ( $K_d$ ) von CCR2 liegt für CCL2/MCP-1 bei ca. 0,5nM, für

CCL8/MCP-2 bei ca. 3,0nM und für CCL7/MCP-3 bei ca. 5,0nM. (Rodriguez-Frade et al. 2001). CCL11/Eotaxin ist ein natürlicher CCR2-Antagonist, er bindet kompetitiv an CCR2 ohne eine Signaltransduktion oder Internalisierung auszulösen (Ogilvie et al. 2001).

Die MCPs sind klassische inflammatorische Chemokine, die gemeinsam in einem Cluster auf Chromosom 17q11.2 liegen. Ihre Expression wird in den meisten Geweben bei einer Gewebeschädigung oder Infektion über proinflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-1, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  rasch induziert bzw. hochreguliert (Luckow et al. 1995). Glukokortikoide, TGF- $\beta$ , IL-10 und IL-13 hemmen die Expression der MCPs (Smith and Herschman 1995; Kucharzik et al. 1998).

Die Bindung von CCL2/MCP-1 an CCR2 führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche eine G<sub>i</sub>-Protein-Aktivierung und intrazelluläre Signalkaskade auslöst (Rodriguez-Frade et al. 1999). Unter anderem kommt es hierbei zu einer raschen cAMP-Reduktion und intrazellulären Calciumerhöhung. Diese CCR2-Aktivierung führt bei Monozyten zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und einer gerichteten Chemotaxis. Zudem wird eine IL-1 und IL-6 Sekretion, eine Ausschüttung von bakteriziden Enzymen und ein *respiratory burst* ausgelöst. Basophile reagieren mit einer Histamin-Ausschüttung und NK-Zellen setzen bakterizide Enzyme frei. Die IL-4 Synthese wird in T-Zellen stimuliert und die IL-12 und IFN- $\gamma$  Synthese in Makrophagen inhibiert (Chensue et al. 1996; Braun et al. 2000; Luther und Cyster 2001). Zudem hemmt CCL2/MCP-1 die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (Rollins und Oppenheim 2001).

### 1.3.2 Der murine Chemokinrezeptor Ccr2

Zwei Arbeitsgruppen gelang es 1996 kurz nacheinander, den murinen Chemokinrezeptor Ccr2 zu klonieren. T. Kurihara und R. Bravo isolierten Ccr2 (*GenBank* U51717) aus einer cDNA-Bibliothek der murinen Monozytenzelllinie *WEHI265.1*. Sie wendeten eine PCR-Klonierungsstrategie mit Primern für zwei konservierte Sequenzen der humanen Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR2 an (Kurihara und Bravo 1996). L. Boring et al. isolierten Ccr2 (*GenBank* U47035), indem sie eine cDNA-Bibliothek der murinen Monozytenzelllinie *WEHI274.1* mit einer radioaktiv markierten CCR2-Gensonde screeneten (Boring et al. 1996). Das Ccr2-Gen liegt auf Maus-Chromosom 9 (72,0 cM), synten der Lokalisation des CCR2-Gens auf dem humanen Chromosom 3p21 (Copeland et al. 1993; Rodriguez-Frade et al. 2001). Das Gen-Produkt Ccr2 ist ein G-Protein gekoppelter 7 Transmembran-Rezeptor von 373 Aminosäuren Länge und 42,7kDa Molekulargewicht. Es zeigt ca. 80% Homologie auf Proteinebene zum humanen CCR2B.

#### Expression des murinen Ccr2-Gens

Es sind nur wenige Daten über die Expression von Ccr2 (*SwissProt* P51683) in der Maus veröffentlicht. mRNA für Ccr2 konnte unter anderem konstitutiv in murinen Monozytenzelllinien nachgewiesen werden (Boring et al. 1996; Kurihara und Bravo 1996).

Durch die Freisetzung von Histamin nach Ccl2/mMCP-1 Stimulation konnte indirekt gezeigt werden, dass murine Mastzellen Ccr2 exprimieren (Campbell et al. 1999). Murine Fibroblasten exprimieren vermehrt Ccr2 nach IL-4 Stimulation (Hogaboam et al. 1999). TNF- $\alpha$  und LPS hemmen die Ccr2-Expression auf murinen Monozyten und Dendritischen Zellen (Vecchi et al. 1999; Zhou et al. 1999). Aufgrund fehlender spezifischer Antikörper lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Daten zur Expression von Ccr2 auf Proteinebene vor. Aufbauend auf der vorliegenden Arbeit, gelang eine weitere Charakterisierung der Expression von Ccr2 in der Maus (Mack et al. 2001).

#### Liganden von Ccr2

Ccr2 bindet die Chemokine Ccl2/mMCP-1 (Rollins et al. 1988), Ccl8/mMCP-2, Ccl7/mMCP-3 (Heinrich et al. 1993; Thirion et al. 1994) und Ccl12/mMCP-5 (Jia et al. 1996), die in einem Cluster auf Maus-Chromosom 11 (46.5 cM) liegen, synten der Lokalisation der CCR2-Liganden auf dem humanen Chromosom 17q11.2.

### **1.3.3 Physiologische und pathophysiologische Rolle von CCR2**

CCR2 spielt eine wichtige Rolle bei der spezifischen Immunantwort. Entzündungsmediatoren wie IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$  und Sauerstoffradikale führen zu einer gesteigerten lokalen Expression von CCR2-Liganden. Dies führt zur Infiltration und Akkumulation von CCR2-exprimierenden Zellen, vor allem Monozyten und T-Zellen in Entzündungsherde (Serbina et al. 2008). Hier ist CCR2 ganz wesentlich an der T<sub>H</sub>1-Immunreaktion, z.B. gegen intrazelluläre Erreger beteiligt. Über die infiltrierenden Zellen hat CCR2 aber auch Anteil an der lokalen Gewebeschädigung akuter Entzündungsreaktionen und der Fibrosierung im Rahmen chronischer Entzündungen. Weitere Einsicht in die komplexe physiologische Rolle von CCR2 haben Experimente mit Ccr2-defizienten Mäusen ergeben.

#### Ccr2-defiziente Mäuse

Die Arbeitsgruppen um I. Charo, R. Bravo und N. Maeda haben unabhängig voneinander Ccr2-*knockout* Mäuse hergestellt und 1997 in kurzer Folge beschrieben (Boring et al. 1997; Kurihara et al. 1997; Kuziel et al. 1997). Auch unserer Arbeitsgruppe gelang es Ccr2-defiziente Mäuse herzustellen (Luckow et al. 2004). Diese Mäuse zeigten unter SPF (*specific pathogen free*) -Bedingungen keine phänotypischen Auffälligkeiten bei Entwicklung, Wachstum, Fertilität oder hematopoetischer Reifung (Kurihara et al. 1997). Sie zeigten aber funktionelle Defizite in der Immunantwort mit einer verminderten Monozyten-Rekrutierung und einer gestörten Makrophagen-abhängigen T<sub>H</sub>1-Immunreaktion im Unterschied zu Wildtyp-Mäusen. In Chemotaxis-Assays reagierten Leukozyten von Ccr2-defizienten Mäusen nicht auf Ccl2/mMCP-1.

Nach intraperitonealer Thioglycolat-Injektion kam es bei Ccr2-defizienten Mäusen zu einer verminderten endothelialen Adhäsion und Extravasation von Monozyten sowie einer signifikanten Reduktion von infiltrierenden Makrophagen in die Bauchhöhle (Boring et al.

1997). In  $T_H1$ -Granulom-Modellen mit intravenöser Injektion von  $\beta$ -Glucan oder PPD-Tuberculin-Antigen entwickelten sie kleinere Granulome, mit deutlich weniger eingewanderten Makrophagen (Kuziel et al. 1997). In den drainierenden Lymphknoten sammelten sich sowohl deutlich weniger Antigen-präsentierende Zellen als auch IFN- $\gamma$ -produzierende T-Lymphozyten (Peters et al. 2000; Sato et al. 2000). Dies führte zu einer stark eingeschränkten Antigen-abhängigen IFN- $\gamma$ -Produktion und defizienten  $T_H1$ -Immunantwort (Boring et al. 1997). Auch bei einer Infektion mit *Cryptococcus neoformans* fand sich bei Ccr2-defizienten Mäusen ein Wechsel von einer  $T_H1$ - zu einer  $T_H2$ -Immunantwort mit einer signifikant reduzierten IFN- $\gamma$ -Produktion und einer gesteigerten IL-4 und IL-5 Synthese im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Traynor et al. 2002).

Die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen spielt vor allem in der Abwehr von intrazellulären Erregern und Pilzinfektionen eine wichtige Rolle. So zeigten Ccr2-defiziente Mäuse aufgrund der gestörten Rekrutierung von Makrophagen auch erhebliche Defizite in der Abwehr von Infektionen mit den intrazellulären Bakterien *Mycobacterium tuberculosis* (Peters et al. 2001; Peters et al. 2004) und *Listeria monocytogenes* (Kurihara et al. 1997), dem intrazellulären Parasiten *Leishmania major* (Sato et al. 2000) oder dem bekapselten Hefepilz *Cryptococcus neoformans* (Traynor et al. 2000). Infektionen von Ccr2-defizienten Mäusen mit dem neurotrophen *Mouse hepatitis virus* oder dem murine *Gammaherpesvirus* führten zu einer gestörten Viruselimination mit erhöhter Mortalität (Chen et al. 2001; Cadillac et al. 2005). Die abgeschwächte  $T_H1$ -Immunantwort kann aber auch vor einer überschießenden lokalen Gewebeschädigung schützen. So zeigten Ccr2-defiziente Mäuse bei Infektion mit dem *Influenza A*-Virus zwar eine gestörte Viruselimination mit 10-100-fach höheren Virustitern, aber auch eine deutlich geringere Lungenschädigung, mit einer im Verlauf höheren Überlebensrate im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Dawson et al. 2000; Wareing et al. 2007).

#### CCR2 und Lungenerkrankungen

CCL2/MCP-1 führt zu einer direkten CCR2-vermittelten Mastzelldegranulation mit dosisabhängiger Histaminausschüttung und Bronchokonstriktion. Diese bronchiale Hyperreagibilität ist bei Ccr2-defizienten Mäusen aufgehoben (Campbell et al. 1999). Gleichzeitig zeigten sie eine in Richtung  $T_H2$  verschobene Immunantwort mit einer gesteigerten allergischen Atemwegsreaktion auf *Aspergillus* (Blease et al. 2000) und Ovalbumin (Kim et al. 2001). CCR2 scheint auch eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der Lungenfibrose zu spielen. CCR2 wird auf pulmonalen Fibrozyten exprimiert (Moore et al. 2005) und ist an der Synthese extrazellulärer Matrix wie Typ I Kollagen über profibrotische Zytokine wie z.B. TGF- $\beta$  beteiligt (Gharaee-Kermani et al. 1996; Hogaboam et al. 1999). Ccr2-defiziente Mäuse sind weitgehend geschützt vor der Entwicklung einer Lungenfibrose nach Bleomycin- oder FITC-Exposition (Moore et al. 2001; Gharaee-Kermani et al. 2003). Sie zeigten auch einen abgeschwächten Verlauf einer Bronchiolitis obliterans Pneumonie im



Rahmen einer chronischen Abstoßungsreaktion nach Tracheatransplantation (Belperio et al. 2001).

#### CCR2 und Nierenerkrankungen

Bei verschiedenen glomerulären und tubulointerstitiellen Nierenerkrankungen sowie in murinen Modellen der renalen Ischämie, der Hydronephrose, verschiedener Glomerulonephritiden, der diabetischen Nephropathie und der renovaskulären Hypertonie fand sich eine erhöhte Expression von CCL2/MCP-1 mit Einwanderung von CCR2-positiven Entzündungszellen (Grandaliano et al. 1996; Segerer et al. 2000; Anders et al. 2003). Diese eingewanderten CCR2-positiven Zellen setzten selber Entzündungsmediatoren und Chemokine frei und beeinflussten so wesentlich den Verlauf von Nierenentzündung und Fibrosierung (Wada et al. 2001). Durch die Blockade von Ccl2/mMCP-1 konnte die Typ I Kollagen Ablagerung und interstitielle Fibrose bei der extrakapillär proliferativen Glomerulonephritis deutlich reduziert werden (Lloyd et al. 1997). Durch die Blockade oder Deletion von Ccl2/mMCP-1 konnte die renale Makrophageninfiltration und tubuläre Nierenschädigung im Modell der Nephrotoxischen Serum Nephritis reduziert werden (Fujinaka et al. 1997; Tesch et al. 1999). Im Gegensatz hierzu zeigten Ccr2-defiziente Mäuse nach Injektion von Anti-GBM-Antikörper trotz verminderter Makrophagen-Infiltration eine schwerer verlaufende Glomerulonephritis (Bird et al. 2000). In MRL-FAS<sup>lpr</sup>-Mäusen, einem Lupus-Nephritis-Modell, ist Ccl2/mMCP-1 wesentlich an der Leukozyteninfiltration und anschließenden Entwicklung von Nierenschädigung und Proteinurie beteiligt (Perez de Lema et al. 2001). Die in unserer Arbeitsgruppe hergestellten Ccr2-knockout Mäuse zeigten einen deutlich abgeschwächten Verlauf der autoimmunen Nephritis (Perez de Lema et al. 2005). Nach einseitiger Ureterligation exprimierten Ccr2-defiziente Mäuse weniger TGF- $\beta$  und Typ 1 Kollagen und zeigten eine verminderte interstitielle Fibrose (Kitagawa et al. 2004). Im Modell der renalen Ischämie zeigten Ccr2-knockout Mäuse nach passagerer Unterbindung der A. renalis eine weniger ausgeprägte akute Tubulusnekrose (Furuichi et al. 2003).

#### CCR2 und Arthritis

Die intraartikuläre Akkumulation von CCR2-positiven Monozyten und T-Zellen spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Gelenkentzündungen. Die Blockade von Ccr2 während der Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis, einem murinen Modell der Rheumatoiden Arthritis, führte zu einer Reduktion von Ccr2-positiven Monozyten und einer deutlichen Abschwächung der Arthritis (Brühl et al. 2004; Brühl et al. 2007). Überraschenderweise entwickelten Ccr2-defiziente Mäuse aber eine schwerere Form der rheumatoiden (Quinones et al. 2004) und auch der postinfektiösen Arthritis (Quinones et al. 2006).

#### CCR2 und kardiovaskuläre Erkrankungen

CCR2 spielt sowohl in der Entstehung der Atherosklerose als auch der Entwicklung der ischämischen Herzerkrankung eine wichtige Rolle. Ein Charakteristikum atherosklerotischer Plaques ist die CCL2/MCP-1-abhängige Akkumulation von Monozyten/Makrophagen, die

sich unter Lipidanreicherung in Schaumzellen umwandeln (Wilcox et al. 1994). Interessanterweise führen die atherosklerotischen Risikofaktoren oxidiertes LDL, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie zu einer Steigerung der CCL2/MCP-1-Expression in Endothel- und glatten Muskelzellen (Bush et al. 2000). Statine hingegen hemmen die Synthese von CCL2/MCP-1 (Romano et al. 2000), und Östrogene reduzieren die CCR2-Expression (Janis et al. 2004). Die Deletion von *Ccr2* schützte sowohl vor der Entwicklung einer Diät-induzierten (Boring et al. 1998; Dawson et al. 1999; Guo et al. 2005) als auch vor einer Hypertonie-induzierten Atherosklerose (Ishibashi et al. 2004). *Ccr2*-defiziente Mäuse zeigten nach kardialer Ischämie eine geringere Anzahl an infiltrierenden Makrophagen sowie eine reduzierte Myokardinfarktgröße (Kaikita et al. 2004; Hayasaki et al. 2006).

#### CCR2 und Multiple Sklerose

In den für die Multiple Sklerose charakteristischen Demyelinisierungsherden ist CCL2/MCP-1 stark hochreguliert und es akkumulieren CCR2-positive Makrophagen und T-Zellen (Ransohoff et al. 1997; McManus et al. 1998). Bei der EAE (*experimental autoimmune encephalitis*), einem murinen Modell der Multiplen Sklerose, führte die Blockade von *Ccl2/mMCP-1* zu einer signifikanten Abschwächung des Krankheitsverlaufs (Karpus und Kennedy 1997). Noch eindrücklicher sind die Ergebnisse bei *Ccr2*-defizienten Mäusen, die sich aufgrund einer fehlenden ZNS-Infiltration mit Monozyten/Makrophagen immun gegen die Entwicklung einer EAE zeigten (Fife et al. 2000; Izikson et al. 2000). Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse einer weiteren Arbeit, in der *Ccr2*-defiziente Mäuse trotz fehlender Einwanderung von Monozyten sehr wohl eine EAE aufgrund einer vermehrten Infiltration mit Neutrophilen entwickelten (Gaupp et al. 2003).

#### CCR2 und HIV

Mit Ausnahme einzelner HIV-1-Laborstämme (wie z.B. *HIV-89.6*) wird CCR2 in der Regel nicht als HIV-Corezeptor genutzt (Doranz et al. 1996). In einigen Kohortenstudien zeigte sich aber eine Verzögerung der AIDS-Progression bei Patienten mit einer CCR2-Punktmutation (CCR2-V64I), die weltweit mit einer Häufigkeit von 10-20% vorkommt (Smith et al. 1997; Kostrikis et al. 1998).

## **1.4 DER CHEMOKINREZEPTOR CCR5**

### **1.4.1 Der humane Chemokinrezeptor CCR5**

1986 wurde beobachtet, dass  $CD8^+$ -T-Lymphozyten die HIV-Replikation *in vitro* hemmen (Walker et al. 1986). 1995 gelang es, aus Kultur-Überständen von  $CD8^+$ -T-Lymphozyten lösliche HIV-Suppressor-Faktoren zu isolieren und zu identifizieren. Es handelte sich um die CC-Chemokine CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES (Cocchi et al. 1995).

1996 publizierten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Klonierung und funktionelle Charakterisierung des MIP-1 $\alpha$ -, MIP-1 $\beta$ - und RANTES-Rezeptors CCR5.

Die Arbeitsgruppe um M. Parmentier isolierte CCR5 (*ChemR13*, *GenBank* X91492) aus einer humanen  $\lambda$ -Gen-Bibliothek. Sie verwendeten eine Hybridisierungssonde, die sie mit Oligonukleotiden für konservierte Bereiche der dritten und sechsten Transmembrandomäne bekannter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren amplifiziert hatten (Libert et al. 1989; Samson et al. 1996a). Die Arbeitsgruppe um P. Murphy screenete eine humane  $\lambda$ -cDNA-Bibliothek mit der ORF-Sequenz von CCR2B und isolierte ebenfalls CCR5 (*GenBank* U57840; Combadiere et al. 1995; Combadiere et al. 1996). Die Arbeitsgruppen von I. Charo und P. Gray screeneten zwei überlappende humane YAC-Klone, auf denen auch CCR1 und CCR2 kodiert waren, mit einer PCR-Klonierungs-Strategie unter Verwendung von Primern für konservierte Bereiche von CCR1, CCR2 und CX3CR1. Eine der so amplifizierten Sequenzen kodierte ebenfalls CCR5 (*GenBank* U54994; Raport et al. 1996).

#### CCR5, HIV und CCR5 $\Delta$ 32-Mutation

Faszinierenderweise hat sich CCR5 als wichtigster Corezeptor für HIV-1 herausgestellt. Schon lange war bekannt, dass HIV einen zweiten Rezeptor neben CD4 für die Infektion benötigt (Clapham et al. 1991; Levy 1996). Durch die Co-Transfektion von CD4<sup>+</sup> und CCR5 gelang es erstmalig, nicht-humane Zellen mit M-tropen HIV zu infizieren (Alkhatib et al. 1996; Choe et al. 1996; Deng et al. 1996; Doranz et al. 1996; Dragic et al. 1996). Die Bindung von CD4 an das HIV-Oberflächenprotein *gp120* induziert eine Konformationsänderung von *gp120* und ermöglicht eine sequentielle Bindung von CCR5 (Kwong et al. 1998; Rizzuto et al. 1998). Dies führt zu einer über das HIV-Membranprotein *gp41*-vermittelten Membranfusion und Virus-Penetration (Doms und Moore 2000).

Die herausragende Bedeutung von CCR5 wurde noch untermauert durch die Entdeckung einer CCR5-Genmutation (CCR5 $\Delta$ 32), bei der Homozygote weitgehend vor einer HIV-Infektion geschützt waren (Dean et al. 1996; Liu et al. 1996; Samson et al. 1996b). Heterozygote zeigten eine um ca. 2 Jahre verzögerte Progression zu dem Stadium AIDS (Michael et al. 1997; Stewart et al. 1997). Bei dieser Mutation kommt es aufgrund einer Deletion von 32 Basenpaaren im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens mit vorzeitigem Kettenabbruch. Hieraus resultiert ein trunkiertes CCR5-Protein mit nur 215 Aminosäuren, welches nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Huang et al. 1996).

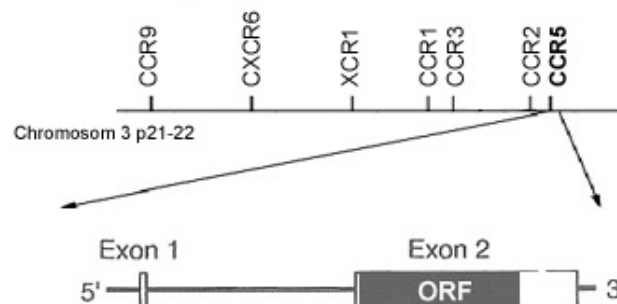
Diese CCR5 $\Delta$ 32-Mutation ist die häufigste natürliche Mutation in der europäischen Bevölkerung. Sie zeigt einen Nord-Süd-Gradienten mit einer Mutations-Frequenz von 5-15% in einem Allel (heterozygot) und in bis zu 1% in beiden Allelen (homozygot). In zentralafrikanischen oder ostasiatischen Bevölkerungsgruppen ist sie nicht zu finden (Martinson et al. 1997). Genetische Untersuchungen lassen eine natürliche Selektion mit Überlebensvorteil für Träger der CCR5 $\Delta$ 32-Mutation vor etwa 700-2500 Jahren vermuten (Libert et al. 1998; Stephens et al. 1998). Als Auslöser wird eine der großen Epidemien in

Europa wie z.B. die Beulenpest (Elvin et al. 2004), hämorrhagisches Fieber (Duncan et al. 2005), Pocken (Lalani et al. 1999) oder Influenza (Stephens et al. 1998) diskutiert. Andere argumentieren, dass es auch ganz ohne Selektionsdruck zu der beobachteten Allelfrequenz kommen konnte (Sabeti et al. 2005).

Kohortenstudien haben für homozygote Träger der CCR5 $\Delta$ 32-Mutation ein vermindertes Herzinfarktrisiko (Gonzalez et al. 2001), ein längeres Nierentransplantatüberleben (Fischereder und Luckow et al. 2001) und einen leichteren Verlauf einer Rheumatoiden Arthritis (Zapico et al. 2000; Gomez-Reino et al. 1999) aufgezeigt. Bei symptomatischer *West Nil Virus*-Infektion fanden sich vermehrt homozygote CCR5 $\Delta$ 32-Mutations-Träger (Glass et al. 2006). Es ergab sich keine Assoziation mit Diabetes mellitus Typ1 (Szalai et al. 1999; Gambelunghe et al. 2003), chronisch entzündlicher Darmerkrankung (Craggs et al. 2001; Martin et al. 2001), Multipler Sklerose (Bennetts et al. 1997) oder allergischem Asthma (Sandford et al. 2001).

#### Organisation des humanen CCR5-Gens

Das CCR5-Gen befindet sich in gleicher Orientierung 17,5kb unterhalb des CCR2-Gens im Chemokinrezeptor-Cluster auf Chromosom 3p21 (Maho et al. 1999). Es besteht aus 2 Exons, die durch ein 1,9kb großes Intron getrennt sind. Exon 1 enthält 43bp der 5'-UTR (*untranslated region*); Exon 2 enthält 11bp der 5'-UTR, den gesamten ORF (*open reading frame*) und den 3'-UTR von CCR5 (Guignard et al. 1998). Zwei alternative Promotoren (Mummidi et al. 1997), eine TATA-Box sowie potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT, NF-AT, CD28RE und C/EBP sind beschrieben worden (Liu et al. 1998; Rosati et al. 2001).



#### Abb. 1-6 Organisation des humanen CCR5-Gens

(Abbildung modifiziert nach Guignard et al. 1998, aktualisiert nach [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) 2008)

#### Expression des humanen CCR5-Gens

Das humane CCR5-Protein (*SwissProt* P51681) besteht aus 352 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 40,6kDa und ist zu 76% identisch mit CCR2B (Blanpain et al. 2001).

Die Expression von CCR5 zeigt eine interindividuelle Heterogenität im Expressionsniveau und ist abhängig von Zelltyp, Differenzierung und Aktivierung (Wu et al. 1997). CCR5 wird im Gegensatz zu CCR2 hauptsächlich auf gewebeständigen Makrophagen und weniger auf zirkulierenden Monozyten exprimiert (Tuttle et al. 1998; Kaufmann et al. 2001a). Auch T<sub>H</sub>1-Zellen sowie naive und Gedächtnis-T-Zellen sind CCR5 positiv (Loetscher et al. 1998). CCR5 wurde auch auf Dendritischen Zellen (Rubbert et al. 1998; Castellino et al. 2006), Langerhanszellen (Zaitseva et al. 1997), Mikrogliazellen (Albright et al. 1999), NK-Zellen (Mack et al. 2001), Thymozyten (Dairaghi et al. 1998), Endothelzellen (Berger et al. 1999) und vaskulären glatten Muskelzellen (Schechter et al. 2000) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu exprimieren Neutrophile, Eosinophile, B-Zellen und T<sub>H</sub>2-Zellen CCR5 in aller Regel nicht (Blanpain et al. 2001).

Proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-12 sowie T<sub>H</sub>1-assoziierte Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-2 führen zu einer gesteigerten Expression von CCR5 (Hariharan et al. 1999; Patterson et al. 1999; Zou et al. 1999; Yang et al. 2001). Im Gegensatz hierzu hemmen Wandbestandteile von gramnegativen Bakterien wie LPS oder grampositiven Bakterien wie Lipoteichonsäure sowie die T<sub>H</sub>2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 die CCR5-Expression (Moriuchi et al. 1998; Wang et al. 1998; Franchin et al. 2000).

#### Liganden von CCR5

Die inflammatorischen CC-Chemokine CCL3/MIP-1 $\alpha$  (Obaru et al. 1986), CCL4/MIP-1 $\beta$  (Wolpe et al. 1989) und CCL5/RANTES (Schall et al. 1988; Raport et al. 1996) führen zu einer CCR5-Aktivierung mit intrazellulärer Calciumfreisetzung, Rezeptorphosphorylierung und Internalisierung (Mueller et al. 2002). CCL8/MCP-2 bindet CCR5 zwar mit hoher Affinität ( $K_d$  ca 1,5 nM) (Wu et al. 1997a), die Daten zu Calciumfreisetzung und Rezeptorinternalisierung sind aber widersprüchlich (van Damme et al. 1992; Gong et al. 1998; Mueller et al. 2002). CCL13/MCP-4 bindet CCR5 mit niedrigerer Affinität und führt zu einer intrazellulären Calciumfreisetzung, aber nicht zu einer Rezeptorphosphorylierung oder relevanten Internalisierung (Mueller et al. 2002). CCL7/MCP-3 wirkt antagonistisch, indem es CCR5 kompetitiv bindet, aber nicht aktiviert (Blanpain et al. 1999). CCL11/Eotaxin bindet CCR5 mit niedrigerer Affinität und führt zu einer intrazellulären Calciumfreisetzung und Rezeptorinternalisierung (Ogilvie et al. 2001). Soweit bekannt bindet CCL4/MIP-1 $\beta$  selektiv an CCR5. CCL3/MIP-1 $\alpha$  bindet auch CCR1; CCL5/RANTES bindet auch CCR1 und CCR3; und CCL8/MCP-2 bindet auch CCR1, CCR2 und CCR3 (Blanpain et al. 2001). Die Gene dieser Chemokine liegen in einem Cluster auf dem Chromosom 17q11-12 (Miller und Krangel 1992).

Die Expression von CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES wird wie bei den MCPs in einer Vielzahl von Zellen innerhalb von wenigen Stunden nach proinflammatorischen Stimuli wie z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , LPS oder viralen Infekten induziert bzw. hochreguliert (Sherry et al. 1998). Makrophagen und Dendritische Zellen sezernieren CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES im Rahmen der Antigen-Präsentation

(Kornbluth et al. 1998; McDyer et al. 1999). Nach Antigen-Aktivierung produzieren sowohl B- als auch T-Lymphozyten CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES (Wagner et al. 1998). In T-Zellen wird CCL5/RANTES meist erst nach einer Latenz von 3-5 Tagen als *late response*-Gen hochreguliert (Nelson et al. 1996; Song et al. 2000). Thrombozyten und Eosinophile können CCL5/RANTES präformiert aus Speichergranula ausschütten (Schall et al. 2001).

*In vivo* ergibt sich aufgrund der Integration multipler immunmodulatorischer Zytokine ein differenziertes und komplexes Expressionsmuster der CCR5-Liganden (Sherry et al. 1998; Kopydlowski et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass daran eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren einschließlich STAT-1, NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP, MNP, RFLAT-1 und IRF3 beteiligt sind (Grove und Plumb 1993; Ritter et al. 1995; Ohmori et al. 1997; Lin et al. 1999; Song et al. 1999).

Eine Aktivierung von CCR5 löst eine für Chemokinrezeptoren typische Signaltransduktionskaskade mit einer G<sub>i</sub>-Protein vermittelten Calciummobilisierung und Aktivierung von Tyrosinkinase aus. Dies führt, unter anderem, zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, zur gerichteten Diapedese und zur Chemotaxis (Blanpain et al. 2001).

#### 1.4.2 Der murine Chemokinrezeptor Ccr5

Zwei Arbeitsgruppen gelang 1996 die Klonierung der murinen Ccr5-cDNA. Boring et al. screenen eine murine Monozyten cDNA-Bibliothek mit einer radioaktiv markierten humanen CCR2-Gensonde und identifizierten so neben Ccr2 auch Ccr5 (*GenBank* U47036; Boring et al. 1996). Meyer et al. isolierten Ccr5 (*AM4-7*; *GenBank* X94151) aus einer murinen Thymus-cDNA-Bibliothek. Sie verwendeten eine Hybridisierungssonde für konservierte Sequenzabschnitte der zweiten intrazellulären Schleife und der siebten Transmembrandomäne der humanen Chemokinrezeptoren CCR1 bis 4 (Meyer et al. 1996). Das murine Ccr5-Protein (*SwissProt* P51682) hat eine Länge von 354 Aminosäuren und ist auf Proteinebene zu 80% identisch mit dem humanen CCR5-Protein und zu 72% identisch mit dem murinen Ccr2-Protein. Das Ccr5-Gen liegt wie auch das Ccr2-Gen auf dem Maus-Chromosom 9 (72.0 cM) (Meyer et al. 1996).

##### Expression des murinen Ccr5-Gens

Die Ccr5-mRNA konnte in murinen Makrophagen und T-Lymphozyten, nicht aber in Eosinophilen, Neutrophilen oder B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Boring et al. 1996; Meyer et al. 1996). Wie bei Ccr2 lagen zu Beginn der vorliegenden Arbeit, aufgrund fehlender spezifischer Antikörper, keine Daten zur Expression von Ccr5-Protein vor. Aufbauend auf der vorliegenden Arbeit gelang eine weitere Charakterisierung der Ccr5-Expression auf Proteinebene. Das Expressionsmuster von Ccr5 bei der Maus zeigte sich dem von CCR5 beim Menschen sehr ähnlich. Eine Ausnahme bildeten murine NK-Zellen, die zum

größten Teil Ccr5-positiv sind, wohingegen nur eine kleine Subpopulation humaner NK-Zellen CCR5 exprimiert (Mack et al. 2001).

#### Liganden von Ccr5

Ccr5 bindet die Chemokine Ccl3/mMIP-1 $\alpha$  (Davatellis et al. 1988), Ccl5/mRANTES (Schall et al. 1992) und Ccl4/mMIP-1 $\beta$  (Sherry et al. 1988; Meyer et al. 1996), die in einem Gen-Cluster auf Maus-Chromosom 11 liegen (Danoff et al. 1994). Eine Vielzahl von murinen Zellarten exprimiert diese Chemokine nach Behandlung mit proinflammatorischen Stimuli wie LPS oder TNF- $\alpha$  (van Otteren et al. 1994; Proffitt et al. 1995).

### **1.4.3 Physiologische und pathophysiologische Rolle von CCR5**

Bei einer Vielzahl von Infektionen, Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen kommt es zur Expression von CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES sowie zur Akkumulation von CCR5-positiven Leukozyten. In einer Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CCR5 eine komplexe Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen, Dendritischen Zellen, NK-Zellen, T<sub>H</sub>1-Lymphozyten und T<sub>C</sub>1-Lymphozyten im Rahmen der zellulären Immunantwort spielen. Zudem scheint CCR5 zusammen mit CCR7 wesentlich an der Generierung von Gedächtnis-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beteiligt zu sein. Nach Antigenkontakt wird die Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen über eine zeitgleiche Expression von CCR5 koordiniert (Castellino et al. 2006).

#### Ccr5-defiziente Mäuse

Die Arbeitsgruppe um R. Bravo hat Ccr5-defiziente Mäuse hergestellt und 1998 erstmals beschrieben (Zhou et al. 1998). In der Folge haben noch einige weitere Arbeitsgruppen, einschließlich unserer eigenen Ccr5-*knockout*-Mäuse hergestellt (Luckow et al. 2004). Diese Mäuse wuchsen unter SPF (*specific pathogen free*) -Bedingungen phänotypisch unauffällig und gesund auf. Bei der Thioglykolat-induzierten Peritonitis und der Lebergranulombildung nach intravenöser Glucan-Injektion zeigten Ccr5-*knockout* Mäuse keine relevante Störung der Migration von Makrophagen oder T-Lymphozyten (Zhou et al. 1998). Bei Infektion mit *Cryptococcus neoformans* zeigten sie aber einen schweren, auf das Gehirn beschränkten Rekrutierungsdefekt von Makrophagen (Huffnagle et al. 1999). Auch bei einer intrakraniellen Infektion mit dem neurotrophen Coronavirus MHV (*Mouse hepatitis virus*) zeigte sich eine signifikante Reduktion der intrazerebralen Makrophageninfiltration (Glass et al. 2001). Mit *West Nile Virus* infizierte Ccr5-defiziente Mäuse zeigten ebenfalls einen intrazerebralen Rekrutierungsdefekt für Makrophagen, NK-Zellen und T-Lymphozyten. Dies führte zu einer unzureichenden Viruselimination und einem raschen, letalen Verlauf (Glass et al. 2005). Bei Infektion mit LCMV (*Lymphocytic choriomeningitis virus*) zeigten Ccr5-*knockout* Mäuse wiederum eine normale Leukozytenrekrutierung ins ZNS und eine robuste zytotoxische T<sub>C</sub>1-abhängige Viruselimination (Nansen et al. 2002). Auch bei der EAE (*experimental*

*autoimmune encephalitis*), einem Maus-Modell der Multiplen Sklerose, zeigte sich kein Einfluss auf Krankheitsverlauf oder Leukozyteninfiltration ins ZNS (Tran et al. 2000).

Ccr5-defiziente Mäuse zeigten nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* eine verminderte IL-12- und IFN- $\gamma$ -Synthese, eine verminderte Rekrutierung von NK-Zellen sowie eine gestörte Erregerelimination (Aliberti et al. 2000; Khan et al. 2006). Nach Infektion von Ccr5-defizienten Mäusen mit *Listeria monocytogenes* fand eine Arbeitsgruppe eine auf die Leber beschränkte Störung der Erregerelimination (Zhou et al. 1998), die sich in einer Folgearbeit aber nicht bestätigte (Zhong et al. 2004). Bei Infektion mit *Yersinia pestis* fand sich kein Überlebensvorteil für Ccr5-knockout Mäuse (Meccas et al. 2004). Es zeigte sich vielmehr eine stark eingeschränkte Phagozytose von *Yersinia pestis* durch Ccr5-defiziente Makrophagen (Elvin et al. 2004). Bei Infektion mit *Leishmania donovani* zeigten Ccr5-knockout Mäuse eine gesteigerte Pathogenelimination bei anfangs verminderter IFN- $\gamma$  Produktion, die aber im weiteren Krankheitsverlauf zunahm (Sato et al. 1999). Bei der DSS (*dextran sodium sulfate*)-induzierten Colitis, einem Modell für die chronisch entzündliche Darmerkrankung, hatte ein Fehlen von Ccr5 keinen Effekt auf die Anzahl infiltrierender Makrophagen. Es zeigte sich aber ein leichter Krankheitsverlauf mit einer vermehrten Synthese von IL-10, IL-4 und IL-5 sowie einer verminderten Synthese von IFN- $\gamma$  (Andres et al. 2000). Bei septischem Schock nach intraperitonealer LPS-Injektion zeigten Ccr5-defiziente Mäuse einen deutlichen Überlebensvorteil (Zhou et al. 1998). Eine Infektion mit *Influenza A* führte in Ccr5-knockout Mäusen überraschenderweise zu einer vermehrten pulmonalen Einwanderung von Makrophagen mit ausgeprägter akuter Pneumonitis. Gleichzeitig war die Viruselimination reduziert und die Mortalität erhöht (Dawson et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Ccr5 die Apoptose von Virus-infizierten Makrophagen bei Infektion mit *Parainfluenza* und *Influenza* hemmt (Tyner et al. 2005). Bei einer Infektion von Ccr5-defizienten Mäusen mit *Mycobacterium tuberculosis* fand sich ebenfalls überraschend eine vermehrte Lymphozyteneinwanderung in die Lunge. Dies hatte aber keinen signifikanten Effekt auf die Granulombildung oder den Krankheitsverlauf (Algood und Flynn 2004; Badewa et al. 2005). Ein durch *Aspergillus fumigatus* induziertes chronisches Asthma verlief bei Ccr5-defizienten Mäusen deutlich abgeschwächt (Schuh et al. 2002; Hogaboam et al. 2005).

#### CCR5 und Rheumatoide Arthritis

Bei der Rheumatoiden Arthritis ist die Gelenkentzündung sowohl durch eine Akkumulation von CCR5-positiven Zellen (Mack et al. 1999) als auch durch eine hohe intraartikuläre Konzentration von CCR5-Liganden wie CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES charakterisiert (Robinson et al. 1995; Brühl et al. 2001; Nanki et al. 2001). Trotzdem hatte ein Fehlen von Ccr5 im Mausmodell keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf im Kollagen-induzierten Arthritis-Modell (Quinones et al. 2004).



### CCR5 und kardiovaskuläre Erkrankungen

Bei Infektion mit *Trypanosoma cruzi* zeigten *Ccr5-knockout* Mäuse eine defiziente Immunantwort mit stark eingeschränkter Rekrutierung von T-Lymphozyten ins Myokard (Machado et al. 2005). In atherosklerotischen Plaques fand man neben CCL2/MCP-1 auch eine Hochregulation von CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES sowie eine Expression von CCR5 auf infiltrierenden Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Das Fehlen von *Ccr5* bei *ApoE-knockout*-Mäusen zeigte in der frühen Phase der Atherosklerose keine Auswirkung auf die Plaqueeentwicklung (Kuziel et al. 2003). Nach einem deutlich längeren Beobachtungszeitraum und unter einer zusätzlichen fettreichen Diät zeigten die *Ccr5*-defizienten Mäuse aber eine deutlich geringere Entwicklung einer Diät-induzierten Atherosklerose (Braunersreuther et al. 2007).

### CCR5 und Transplantatabstoßung

Im Rahmen der zellulären Transplantatabstoßung fand sich eine vermehrte Produktion von CCL5/RANTES und CCL2/MIP-1 $\alpha$  (Pattison et al. 1994; Azzawi et al. 1998; Robertson et al. 1998) sowie eine vermehrte Infiltration von CCR5-positiven Zellen (Hancock et al. 2000; Segerer et al. 2001). *Ccl5/mRANTES*-Antagonisten zeigten im Tiermodell eine protektive Wirkung bei der akuten Nierentransplantatabstoßung (Gröne et al. 1999). Ebenso zeigten *Ccr5*-defiziente Mäuse nach Herztransplantation eine deutlich verminderte Abstoßungsreaktion (Gao et al. 2001; Luckow et al. 2004). Auch nach Inselzelltransplantation zeigten *Ccr5*-defiziente Mäuse ein deutlich verlängertes Transplantatüberleben bei einer verminderten IFN- $\gamma$ - und einer vermehrten IL-4- und IL-5-Synthese (Abdi et al. 2002).

## 1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Untersuchungen an Chemokinrezeptoren und ihren Liganden haben fundamentale Beiträge zu unserem Verständnis der gerichteten Migration und Aktivierung von Leukozyten beige-steuert. Die beiden eng miteinander verwandten Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 werden vor allem auf Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen und unreifen Dendritischen Zellen exprimiert und sind wesentlich an der T<sub>H</sub>1-Immunantwort sowie an chronischen Entzündungsvorgängen beteiligt. Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich die cDNA-Sequenzen und erste Informationen über die mRNA-Expression und *in vitro* Ligandenbindungen der murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 veröffentlicht. Aufgrund fehlender monoklonaler Antikörper existierten keine Daten über die Rezeptorexpression auf Proteinebene.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 in stabilen Zelllinien funktionell zu exprimieren. Anhand der publizierten Daten sollten die kodierenden Sequenzen aus genomischer Maus-DNA mittels PCR amplifiziert und in Plasmidvektoren subkloniert werden. Nach Ausschluss von Mutationen durch DNA-Sequenzierung sollten Expressionskonstrukte für Ccr2 und Ccr5 hergestellt und in CHO-Zellen stabil transfiziert werden. Der Erfolg der Transfektion sollte dann auf DNA-, mRNA- und Proteinebene untersucht werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen sollten Aufschluss über die Oberflächenlokalisation der klonierten Rezeptoren geben und eine funktionelle Charakterisierung ermöglichen. Hierfür waren im Vorfeld polyklonale Kaninchen-Immunsereen gegen die N-terminalen Peptide von Ccr2 bzw. Ccr5 hergestellt worden. Um eine weitere Steigerung der Rezeptorexpression zu erreichen, war die Anwendung eines Gen-Amplifikationssystems unter Verwendung von Methotrexat geplant.

Das Ergebnis dieser Arbeit sollte Grundlage und Werkzeug für eine weitere *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von Ccr2 und Ccr5 bilden. Vor allem sollten die hergestellten Ccr2- und Ccr5-Zelllinien für die Herstellung von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Ccr2 und Ccr5 weiterverwendet werden.

## 2 Material und Methoden

Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *Boehringer Mannheim*, *Merck*, *Pharmacia*, *Roth* und *Sigma* bezogen. Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt, das durch eine *Milli-Q<sup>UF-Plus</sup>*-Anlage der Firma *Millipore* zusätzlich aufgereinigt worden war ( $\text{H}_2\text{O}^{\text{MP}}$ ). Lösungen und Medien wurden in der Regel autoklaviert (20min, 121°C) oder steril filtriert (0,2µm-Filter). Enzyme wurden von den Firmen *Boehringer Mannheim*, *Life Technologies*, *New England Biolabs*, *Perkin Elmer*, *Pharmacia*, *Promega* und *Stratagene* bezogen. Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, in Anlehnung an die Arbeitsvorschriften aus „*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*“ (Sambrook et al. 1989) und „*Current Protocols in Molecular Biology*“ (Ausubel et al. 1994) durchgeführt. Grundlegende Zellkultur-Methoden wurden in Anlehnung an „*Culture of Animal Cells: A manual of basic techniques*“ (Freshney 1994) durchgeführt.

### 2.1 PRÄPARATION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN

#### 2.1.1 Isolierung von DNA

##### Präparation genomischer DNA aus Gewebe und kultivierten Zellen

*Präparation aus Mausgewebe* (Herrmann und Frischauf 1987): Direkt nach der Organentnahme aus einer *CD1*-Maus (*Charles River Wiga*) wurde die Leber gewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit einem gekühlten Mörser wurde das Organ zu einem Pulver zerrieben und in ein 50ml-Polypropylenröhrchen überführt. Pro 100mg Gewebe wurde 1,2ml Lysepuffer (100mM NaCl, 10mM TrisCl (pH 8,0), 25mM EDTA, 0,5% SDS und 0,1mg/ml Proteinase K) zugegeben.

*Präparation aus CHO-Zellen* (Gross-Bellard et al. 1973): Nach dem Absaugen des Mediums wurden konfluente CHO-Zellen in 10cm-Zellkulturschalen 3x mit je 20ml eisgekühltem PBS gewaschen. 2ml Lysepuffer wurde auf die Schale gegeben und die entstehende visköse Mischung in 15ml-Polypropylenröhrchen überführt.

Die Lysate wurden 12-18h über Nacht bei 50°C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit Phenol extrahiert.

##### Reinigung und Konzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen

*Phenol-Extraktion* (Sambrook et al. 1989): Zur Reinigung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde die Phenol-Extraktion als Standardmethode eingesetzt. Dazu wurde eine 0,1-0,4ml Lösung in 1,5ml-*Eppendorf*-Röhrchen mit 1Vol einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 25:24:1) versetzt und gründlich gemischt. Durch Abzentrifugieren (5min, 13.000rpm; *Biofuge 15*, *Heraeus*) wurde eine obere wässrige von einer unteren organischen Phase abgetrennt. Der wässrige, die DNA enthaltende Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues 1,5ml-*Eppendorf*-Röhrchen überführt und nacheinander

mit 1Vol Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 49:1) und 1Vol H<sub>2</sub>O-gesättigtem Diethylether extrahiert.

*Alkoholische Fällung* (Sambrook et al. 1989): Nukleinsäuren aggregieren und präzipitieren bei hohen Konzentrationen (0,1-0,5M) monovalenter Kationen in Anwesenheit von Alkohol. Hierzu wurde der DNA-Lösung 1/10Vol 3M Natriumacetat (pH 5,2) zugesetzt und vermischt. Anschließend wurden 2-2,5Vol 100% Ethanol oder alternativ 0,6-1Vol 100% Isopropanol zugegeben, der Ansatz gründlich gemischt und auf Eis mindestens 15min inkubiert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (15min, 13.000rpm) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die DNA wurde mit 70-80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (10mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM EDTA) gelöst.

#### Isolierung von Plasmid-DNA (Ausubel et al. 1994)

Zur Isolierung von in *E. coli* amplifizierter Plasmid-DNA wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Verfahren eingesetzt. Sie unterscheiden sich in der Menge und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA sowie bezüglich Arbeitsaufwand und Materialkosten.

*Miniprep (1,5ml-Ansatz)*: Für die Gewinnung kleiner Plasmidmengen zur schnellen Analyse rekombinanter Klone wurde die Kochmethode (Holmes und Quigley 1981) angewandt: Hierfür wurden 2ml LB-Medium nach Zusatz von 100µg/ml Ampicillin mit einer transformierten *E. coli*-Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1,5ml der stationären Bakterienkultur wurden in ein *Eppendorf*-Röhrchen überführt, 30s abzentrifugiert (13.000rpm) und der Überstand verworfen. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 400µl STET-Puffer (0,1M NaCl, 10mM TrisCl (pH 8,0), 1mM EDTA, 5% Triton X-100) und Zugabe von 32µl Lysozymlösung (10mg/ml) wurde das verschlossene *Eppendorf*-Röhrchen 45s in kochendes Wasser gehalten und direkt anschließend auf Eis gestellt. Chromosomale DNA wurde gemeinsam mit den lysierten Zelltrümmern abzentrifugiert (10min, 13.000rpm) und das Pellet mit einem Zahnstocher entfernt. Die im Überstand gelöste Plasmid-DNA wurde mit 0,6Vol Isopropanol gefällt. Anschließend wurde sie kurz luftgetrocknet und in 50-100µl TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute lag bei ca. 10µg Plasmid-DNA pro Ansatz.

*Midiprep (50ml-Ansatz)*: Für die Gewinnung größerer Mengen von besonders reiner Plasmid-DNA für Transfektion oder Sequenzierung wurde eine alkalische Lyse durchgeführt und die Plasmid-DNA anschließend über einen CsCl/EtBr-Gradienten aufgereinigt.

*Alkalische-Lyse* (Birnboim 1983): 50ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin wurden mit einer transformierten *E. coli*-Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die stationäre Kultur wurde in sterilen 50ml-Polypropylenröhrchen abzentrifugiert (10min, 4.300 rpm; *Megafuge 1.0R*, *Heraeus*) und der Überstand dekantiert. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Pellet in 4ml Glukosepuffer (*Solution-I*: 50mM Glukose, 25mM Tris/HCl (pH 7,5), 10mM EDTA) resuspendiert und durch vorsichtige Zugabe von 8ml frisch zubereitetem alkalischem Lysepuffer (*Solution-II*: 2N NaOH, 1% SDS) 5min auf Eis lysiert.

Zu dem viskösen Lysat wurde ein Salzpuffer (*Solution-III*: 1Vol 3M Kaliumacetat, 1Vol 2M Essigsäure) zugegeben und die Mischung 10-15min auf Eis inkubiert. Hierbei wurden chromosomale DNA und Protein-SDS-Komplexe gefällt und anschließend mit den restlichen Zelltrümmern abzentrifugiert (10min, 4.300rpm; *Megafuge 1.0R, Heraeus*). Der Überstand wurde in ein frisches 50ml-Polypropylenröhrchen überführt und über mehrere Lagen sterile Gaze filtriert. Die Nukleinsäuren wurden mit 0,8Vol 100% Isopropanol für ca. 15min auf Eis präzipitiert und anschließend abzentrifugiert (15min, 4300rpm). Das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 180µl TE-Puffer gelöst.

*CsCl/EtBr-Gradienten-Aufreinigung* (Radloff et al. 1967): Für eine weitere Aufreinigung wurde die gelöste DNA mit 100µl einer 10mg/ml Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung vermischt und in ein 1,5ml-*Eppendorf*-Röhrchen überführt. Das sich bildende EtBr-Protein-Präzipitat wurde abzentrifugiert (5min, 13.000rpm; *Biofuge 15, Heraeus*) und der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt. Zu diesem wurden 1,1ml einer 7,1M CsCl-Lösung gegeben. In einem 2ml-*Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen (Beckman)* wurden 750µl einer 3,8M CsCl-Lösung vorgelegt und die DNA/CsCl-Lösung vorsichtig mit einer *Pasteur*pipette unterschichtet. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen zugeschweißt und in einer *Beckman-Tisch-Ultrazentrifuge TL100* zentrifugiert (20°C, 3h, 100.000rpm). Entsprechend ihrer relativen Schwimmdichte, bildete sich eine obere Bande mit genomischer DNA und linearisierten Plasmiden sowie eine untere Bande mit intakten zirkulären Plasmiden aus. Unter UV-Licht wurde vorsichtig mit einer Einmalspritze (18G-Kanüle) die untere Plasmidbande abgenommen und das EtBr mehrfach mit CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Für die nun folgende Alkohol-Präzipitation wurde die Lösung mit 4Vol H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> verdünnt und die Plasmid-DNA mit 2,5Vol 100% Ethanol in einem 15ml-*Correx-Zentrifugen-Glasröhrchen* 15min auf Eis gefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (20 min, 10.000rpm; *Sorvall HB6 Rotor*) und das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Die gewonnene hochreine Plasmid-DNA wurde in 100µl TE-Puffer gelöst und die DNA-Konzentration bestimmt (s. 2.1.3). Die Ausbeute lag meist zwischen 100-300µg Plasmid-DNA pro 50ml *E. coli*-Flüssigkultur.

## 2.1.2 Isolierung von RNA

Zur Vermeidung einer Kontamination mit exogenen RNasen wurde bei der Isolierung von RNA grundsätzlich mit Handschuhen gearbeitet. Alle Flüssigkeiten, mit Ausnahme von aminhaltigen Lösungen (z.B. Tris), wurden mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, um evtl. vorhandene RNasen zu inaktivieren. DEPC wurde durch Autoklavieren inaktiviert.

### *Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen* (*Chomczynski und Sacchi 1987*)

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die konfluenten 10cm-Zellkulturschalen 2x mit 20ml eisgekühltem PBS gewaschen. Pro 10cm-Schale wurden 800µl Denaturierungslösung (*Solution-D*: 4M Guanidiniumthiocyanat, 25mM Natriumcitrat, 0,5% N-Lauroylsarkosin,

0,1M  $\beta$ -Mercaptoethanol) unter dem Abzug zugegeben und das viskose Lysat mit einem Gummischaber in ein 2,2ml-*Eppendorf*-Röhrchen überführt. Das Lysat wurde nun nacheinander mit 80 $\mu$ l 2M Natriumacetat (pH 4,0), 800 $\mu$ l wassergesättigtem Phenol und 160 $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) gemischt und anschließend 15min auf Eis inkubiert. Durch Abzentrifugieren (4°C, 15min, 13.000rpm) wurde eine obere wässrige Phase, die die gelöste RNA enthält, von einer unteren Phenol-Phase mit der genomischen DNA sowie der Interphase mit denaturierten Proteinen getrennt.

#### Reinigung und Konzentrierung der Gesamt-RNA aus wässrigen Lösungen

Die obere wässrige Phase wurde in ein 1,5ml-*Eppendorf*-Röhrchen überführt und die RNA durch Zugabe von 1Vol 100% Isopropanol für 1h bei -20°C präzipitiert. Nach Abzentrifugieren (15min, 13.000rpm) wurde der Überstand abgegossen und das RNA-Pellet in 300 $\mu$ l *Solution-D* gelöst. Durch Zugabe von 1Vol 100% Isopropanol wurde die RNA ein zweites Mal für 1h bei -20°C gefällt. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand erneut abgegossen und die RNA mit 80% Ethanol (mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> hergestellt) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde nun für 5min bei 65°C in 100 $\mu$ l DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> gelöst und bei -20°C gelagert. Die Integrität der RNA wurde auf einem Agarosegel kontrolliert.

### **2.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte in Quartz-Küvetten mit einem *DU-62*-Spektralphotometer (*Beckman*) durch die Messung der Absorption im UV-Bereich bei 260nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum für DNA und RNA). Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht ca. 50 $\mu$ g/ml dsDNA oder ca. 40 $\mu$ g/ml ssDNA bzw. RNA. Eine Proteinverunreinigung (Absorptionsmaximum für Proteine 280nm) wurde anhand des Quotienten OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> abgeschätzt. Reine DNA besitzt einen OD-Quotienten von >1,8, reine RNA von 2,0. Kontaminationen, insbesondere durch Proteine, reduzieren diese Werte (Sambrook et al. 1989).

### **2.1.4 Gelelektrophorese**

#### Agarose-Gelelektrophorese von DNA

*Herstellung der Agarosegele:* In der vorliegenden Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,6-2% in 1x TAE-Puffer (0,04M Tris-Acetat, 1mM EDTA) hergestellt. Sowohl das Gel als auch der Laufpuffer enthielten EtBr in einer Konzentration von 0,5 $\mu$ g/ml.

*Gelelektrophorese:* Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer vollständig mit 1x TAE-Laufpuffer (mit 0,5 $\mu$ l/ml EtBr) bedeckt. Die zu untersuchenden Proben sowie ein Längenstandard (1kb-Leiter, *Invitrogen*) wurden mit 1/6Vol 6x DNA-Ladepuffer (15% Ficoll-400, 0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau) versetzt und langsam in die

Geltaschen pipettiert. Bei der Analyse von Miniprep-DNA wurde ein spezieller Ladepuffer mit zusätzlich 12,5mM EDTA und 0,25mg/ml RNaseA verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in der Regel bei Raumtemperatur mit 90V Spannung für ca. 60min aufgetrennt.

*Photodokumentation:* Das Gel wurde nach Ablauf der Elektrophorese auf einem UV-Transilluminator (Wellenlänge 254nm) gelegt und mit Hilfe eines digitalen Geldokumentationssystems fotografiert.

#### DNA-Isolierung aus einem „low melting point“ Agarosegel

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein 0,8% „low melting point“ Agarosegel mit einer sehr reinen, modifizierten Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (ca. 65°C) hergestellt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die DNA-Banden auf einem langwelligen UV-Transilluminator (Wellenlänge 312nm) sichtbar gemacht und die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen DNA-Gelstücke wurden gewogen und in 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. 1/10Vol 3M Natriumacetat-Lösung (pH 7,0) wurde zugegeben und die Agarose 10min lang bei 65°C im Wasserbad geschmolzen. Anschließend wurde 1Vol Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) zugegeben, gut vermischt, und die Phasen wurden durch Zentrifugieren (5min, 13.000rpm) getrennt. Die weitere Phenol-Extraktion und alkoholische Fällung erfolgten wie zuvor beschrieben. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst.

#### Analytische RNA-Gelelektrophorese

Jede isolierte RNA wurde auf Kontamination mit DNA und mögliche Degradation überprüft. Hierzu wurden ca. 2µg Gesamt-RNA in 2µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit RNA-Ladepuffer (2µl 10x MOPS-Puffer, 10µl Formamid, 5µl 37% Formaldehyd, 1µl 1mg/ml EtBr) gemischt und 15min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde die RNA-Probe auf Eis abgeschreckt und auf einem analytischen 1% Agarosegel mit 1x MOPS-Puffer (20mM MOPS, 5mM NaAcetat, 1mM EDTA, pH 7,0) 60min bei 70V aufgetrennt. Als Kriterium für die Qualität einer RNA-Präparation diente das Vorhandensein von scharf getrennten 28S und 18S rRNA-Banden in einem erwarteten Verhältnis von etwa 2:1.

## **2.2 ENZYMATISCHE MANIPULATION VON NUKLEINSÄUREN**

Eine Reihe von Enzymen erlaubte die spezifische Manipulation von Nukleinsäuren. Zu diesen gehörten die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NdeI* (*Boehringer Mannheim*), *SrfI* (*Stratagene*), *XbaI* und *SalI* (*New England Biolabs*), die *T4-DNA-Ligase* (*New England Biolabs*), die reverse Transkriptase *SUPERSCRIPT* (*Life Technologies*) und die thermostabilen DNA-Polymerasen *Taq* und *AmpliTaq-FS* (*Perkin Elmer*) sowie *Pfu* (*Stratagene*). Alle Enzyme wurden bei -20°C gelagert und bei Verwendung auf Eis gestellt. Die enzymatischen Reaktionen wurden immer durch Zugabe des Enzyms gestartet.

### 2.2.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen können dsDNA sequenzspezifisch schneiden. An der Schnittstelle werden, abhängig vom Enzym, überhängende *sticky ends* oder glatte *blunt ends* generiert. Die eingesetzte Enzymmenge wird in Units (U) angegeben. Laut Definition entspricht 1U der Enzymmenge, die 1µg lineare λ-DNA pro Stunde bei 37°C vollständig schneidet. Die Effizienz des Verdau hängt von der Reinheit und Topologie der DNA ab. Bei Miniprep-Kontrollverdauen muss deshalb meist eine deutlich höhere Menge Enzym eingesetzt werden. Da viele Restriktionsenzyme *dam*-methylierte DNA nicht schneiden, wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA Bakterienstämme ohne *dam*-Methylase-Aktivität verwendet. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen *Boehringer Mannheim*, *New England Biolabs* und *Stratagene* bezogen. Der Verdau wurde nach folgendem allgemeinen Protokoll in 1,5ml-*Eppendorf*-Röhrchen durchgeführt:

<b>Restriktionsverdau-Ansatz</b>	
DNA (in TE-Puffer oder H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup> )	ca. 100-200ng
10x Puffer*	2µl
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	ad 20µl
Restriktionsendonuklease	1U
Volumen	20µl

\*Es wurde jeweils der vom Hersteller empfohlene und mitgelieferte optimale Puffer verwendet.

Der Ansatz wurde zum Verdau 1-2h bei 37°C inkubiert. Zur anschließenden Inaktivierung der verwendeten Enzyme wurde der Ansatz 15min lang auf 70°C erhitzt. Das Ergebnis der enzymatischen Spaltung wurde auf einem Agarosegel überprüft.

### 2.2.2 Ligation

DNA-Fragmente, die mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten wurden, haben zueinander komplementäre Enden und können daher miteinander ligiert werden. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von dsDNA. So können DNA-Fragmente mit passenden Enden *in vitro* kovalent verknüpft werden. Die *T4-DNA-Ligase* wurde von *New England Biolabs (NEB)* bezogen. Für die Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren wurde folgender Ansatz verwendet:



**Ligations-Ansatz**

linearisierter Plasmid Vektor (ca. 3kb)		200-300ng
DNA-Insert (ca. 1,5kb)		200-300ng
ATP (10mM)		1,0µl
10x <i>T4-DNA-Ligase</i> -Puffer		1,0µl
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>		ad 9,0µl
<i>T4-DNA-Ligase</i> , 400U ( <i>NEB</i> )	1,0µl	
Volumen		10µl

Die Ligation wurde über Nacht bei 15°C im Wasserbad durchgeführt.

**2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur selektiven *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte für analytische und präparative Zwecke angewendet (Mullis und Faloona 1987; Saiki et al. 1988). Bei der PCR wird dsDNA durch einen Denaturierungsschritt bei ca. 94-96°C in Einzelstränge getrennt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, hybridisieren DNA-Starter-Oligonukleotide (Primer), abhängig von ihrem Schmelzpunkt, bei ca. 55-65°C spezifisch an die Einzelstrangsequenzen. Die Primer werden so gewählt, dass sie die Zielsequenz an beiden Seiten flankieren und so die Amplifikation des zwischen ihnen liegenden DNA-Fragments ermöglichen. In einem dritten Schritt, der Extension, werden die komplementären DNA-Stränge entlang der einzelsträngigen DNA-Matrizen von der DNA-Polymerase synthetisiert. Durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase können diese drei Schritte in einem Thermocycler automatisch wiederholt werden. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des spezifischen DNA-Abschnitts, so dass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung kommt. Nach etwa 30-35 Zyklen ist eine *single copy* Sequenz aus genomischer DNA so weit amplifiziert, dass sie auf einem EtBr-Agarosegel als Bande sichtbar wird.

Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte mit der Taq-Polymerase

Für analytische PCR-Reaktionen wurde die *Taq*-Polymerase (*Perkin Elmer*) eingesetzt.

**PCR-Ansatz für die Analyse genomischer DNA**

H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	14,6µl
10x <i>Taq</i> -Puffer ( <i>Perkin Elmer</i> )	2,5µl
dNTP-Mix (2,0mM; <i>Pharmacia</i> )	2,5µl
<i>forward</i> -Primer (10µM)	2,0µl
<i>reverse</i> -Primer (10µM)	2,0µl
genomische DNA (ca. 200µg/ml)	1,0µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl, <i>Perkin Elmer</i> ),	0,4µl
Volumen	25µl

PCR-Bedingungen (für *Robocycler Gradient 96*, *Stratagene*): 5min 94°C (ein Zyklus); 1min 15s 94°C, 1min 15s 58°C, 2min 30s 72°C (35 Zyklen); 10min 72°C (ein Zyklus).

### Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte mit der Pfu-Polymerase

Für Klonierungsexperimente wurde ausschließlich *Pfu*-Polymerase (*Stratagene*) verwendet. Sie zeigt keine terminale Transferase-Aktivität und generiert PCR-Produkte mit glatten Enden. Zudem besitzt sie eine *proofreading*-5'-Exonuklease-Aktivität, die die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase von ca. 1/5.000 um den Faktor 12 auf < 1/60.000 verringert (Keohavong und Thilly 1989).

#### **PCR-Ansatz für Klonierungsexperimente**

H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	14,0µl
10x <i>Pfu</i> -Puffer ( <i>Stratagene</i> )	2,5µl
dNTP-Mix (2,0mM, <i>Pharmacia</i> )	2,5µl
<i>forward</i> -Primer (10pmol/µl)	2,0µl
<i>reverse</i> -Primer (10pmol/µl)	2,0µl
genomische DNA (ca. 200µg/ml)	1,0µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5U/µl, <i>Stratagene</i> )	1,0µl
Volumen	25µl

**PCR-Bedingungen** (für *Robocycler Gradient 96, Stratagene*): 3min 94°C (ein Zyklus); 1min 15s 94°C, 1min 15s 58°C, 4min 72°C (35 Zyklen); 10min 72°C (ein Zyklus).

### Auftragssynthese von Oligonukleotiden

Mit dem Programm *PRIMER* aus dem Softwarepaket *HUSAR* (Heidelberger Unix Sequence Analysis Resource; <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>) wurden geeignete Oligonukleotide zur Amplifikation und Klonierung der kodierenden Sequenzen von *Ccr2* und *Ccr5* designt. Die Software basiert auf dem *Wisconsin Package Version 10.0* der *Genetics Computer Group (GCG)* der *University of Wisconsin, Madison, USA*. Anhand der veröffentlichten Sequenzen für *Ccr2* und *Ccr5* (Boring et al. 1996) wurden Primer ausgewählt, die den *ORF (open reading frame)* flankieren. Für die Translation in eukaryontischen Zellen wurde bei den *forward*-Primern im ATG-Bereich (Start-Codon) auf eine optimale *Kozak*-Sequenz geachtet. Zur Vereinfachung der Klonierung wurde bei den *forward*-Primern am 5'-Ende eine *XbaI*-Restriktionsschnittstelle und bei den *reverse*-Primern am 3'-Ende eine *SalI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

	<b>Primersequenzen</b>
<b><i>mccr2.for:</i></b>	5'-CGT ↑CTA GAC ACC ATG GAA GAC AAT AAT ATG TTA CCT CAG TTC-3' XbaI Start
<b><i>mccr2.rev:</i></b>	5'-CA G↑TC GAC AAA GGC AAA CTG TCA CTT ACT TTA CAA C-3' SalI Stop
<b><i>mccr5.for:</i></b>	5'-CGT ↑CTA GAC ACC ATG GAT CTT CAA GGG TCA GTT C-3' XbaI Start
<b><i>mccr5.rev:</i></b>	5'-CAG ↑TCG ACG TCA ACC AGG TCA TAA ACC AGT AG-3' SalI Stop

Die Oligonukleotide wurden von *Life Technologies* synthetisiert, lyophilisiert, entsalzt und ohne Schutzgruppen geliefert. Sie wurden in TE-Puffer in einer Konzentration von 100pmol/µl gelöst.

## 2.2.4 Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die Transkription der transfizierten DNA-Sequenzen in CHO-Zellen auf mRNA-Ebene zu kontrollieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Als Reverse Transkription bezeichnet man das Umschreiben von RNA in cDNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Hierfür wurde das Enzym *SUPERSCRIPT* (*Life Technologies*) verwendet. Es besitzt im Vergleich zur *MMLV-Reversen-Transkriptase* keine RNaseH-Aktivität. Ausgehend von Gesamt-RNA transfizierter CHO-Zellen wurde eine mRNA-selektive Erststrang-cDNA-Synthese mit *SUPERSCRIPT* durchgeführt. Dafür wurden Oligo-dT-Primer, die spezifisch mit dem 3'-Poly-A-Ende der mRNAs hybridisieren, eingesetzt. Im Anschluß wurde eine Amplifikation der cDNA mit Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Zur Kontrolle einer Kontamination (z.B. mit genomischer DNA) wurde jede Probe halbiert und nur zu einer Hälfte Reverse-Transkriptase gegeben (RT<sup>+</sup>-Probe). Die andere Hälfte ohne Reverse-Transkriptase wurde ansonsten genau gleich behandelt (RT<sup>-</sup>-Kontrolle).

### 1) Annealing (RNA/Oligo(dT)-Ansatz)

RNA in DEPC-H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	ca. 2µg
Oligo(dT)12-18 Primer (1µg/µl)	0,5µl
DEPC-H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	ad 10µl
Volumen	10µl

Der RNA/Oligo(dT)-Ansatz wurde 5min bei 65°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis abgeschreckt.

### 2) Reverse-Transkription

RNA/Oligo(dT)-Ansatz	10µl
2x RT-Ansatz:	
- 5x <i>SUPERSCRIPT</i> -Puffer ( <i>Life Technologies</i> )	4,0µl
- BSA (1mg/ml; <i>Sigma</i> )	0,1µl
- DEPC-H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	3,5µl
- dNTP (25mM, <i>Pharmacia</i> )	0,4µl
- DTT (0,1M)	1,0µl
- <i>RNAsin</i> (40u/µl, <i>Promega</i> )	0,5µl
- <i>SUPERSCRIPT</i> (200U/µl, <i>Life Technologies</i> )	0,5µl
	⇒ 10µl
Volumen	20µl

Der RNA/Oligo(dT)-Ansatz wurde mit 10µl 2x RT-Ansatz gut gemischt und 1h bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die cDNA gefällt und in 20µl TE gelöst. Als nächster Schritt wurde eine Polymerase-Kettenreaktion mit 1µl 1:10 verdünnter cDNA durchgeführt und das Ergebnis auf einem Agarosegel kontrolliert.

### 3) PCR-Ansatz für cDNA

H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	16,75µl
10x <i>Taq</i> -Puffer ( <i>Perkin Elmer</i> )	2,5µl
dNTP-Mix (2,0mM, <i>Pharmacia</i> )	2,5µl
<i>forward</i> -Primer (10µM)	1,0µl
<i>reverse</i> -Primer (10µM)	1,0µl
cDNA (1:10 verdünnt)	1,0µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl, <i>Perkin Elmer</i> )	0,25µl
Volumen	25µl

PCR-Bedingungen (für Thermocycler *GeneAmp-9600*, *Perkin Elmer*): 3min 94°C (ein Zyklus); 1min 94°C, 1min 58°C, 3min 72°C (35 Zyklen); 10min 72°C (ein Zyklus).

## 2.2.5 Enzymatische Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren

DNA wurde bei Bedarf mit der enzymatischen Methode nach dem Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden (ddNTPs) sequenziert (Sanger et al. 1977). Hierbei wird, von einem Primer ausgehend, enzymatisch ein komplementärer DNA-Strang entlang einer einzelsträngigen DNA-Matrize synthetisiert, bis es durch den Einbau von einem ddNTP zu einem vorzeitigen Kettenabbruch kommt. Es werden vier parallele DNA-Polymerase-Reaktionen in Anwesenheit aller vier dNTPs sowie jeweils einem der vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) angesetzt. Jeder der vier Sequenzieransätze enthält am Ende der Reaktion verschieden lange DNA-Fragmente, die jeweils mit dem gleichen Nukleotid enden. Durch elektrophoretische Auftrennung dieser DNA-Fragmente auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel lässt sich die DNA-Sequenz ermitteln.

Die klonierte Ccr2- bzw. Ccr5-DNA wurde im Vektor *pCR-Script* von T3- und T7-Promotersequenzen flankiert. Dies erlaubte die N- und C-terminale Ansequenzierung mit den T3- und T7-Primern des *ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Core Kits* (Perkin Elmer). Das Kit arbeitet mit fluoreszenzmarkierten T3- und T7-Oligonukleotiden, dNTP/ddNTP-Gemischen und einer modifizierten *Taq*-Polymerase, der *AmpliTaq-FS-DNA-Polymerase*. Sie ist gekennzeichnet durch eine deutlich geringere Diskriminierung zwischen dNTPs und ddNTPs sowie das Fehlen einer 5'→3'-Exonuklease-Aktivität. Mit den T3- und T7-Primern wurden je vier parallele DNA-Polymerase-Reaktionen mit je einem der vier ddNTPs in einem Thermocycler (*GeneAmp-9600*; Perkin Elmer) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Da die Qualität der Sequenzierung abhängig von der Reinheit der DNA ist, wurde nur über CsCl-Gradienten aufgereinigte Plasmid-DNA eingesetzt.

---

### ***ABI PRISM Dye-Primer-Reaktionsansatz***

---

dNTP/ddNTP-Gemisch ( <i>Perkin Elmer</i> )	1µl
5x Sequenzier-Puffer ( <i>Perkin Elmer</i> )	1µl
zugehöriger T3- oder T7-Dye-Primer (0,4pmol/µl; <i>Perkin Elmer</i> )	1µl
<i>AmpliTaq-FS-DNA-Polymerase</i> ( <i>Perkin Elmer</i> )	1µl
Plasmid-DNA (200ng/µl)	1µl
Volumen	5µl*

\*Reaktionsansätze mit ddATP und ddCTP wurden in 5µl Volumen angesetzt. Für Ansätze mit ddGTP und ddTTP wurde jeweils die doppelte Menge eingesetzt (insgesamt 10µl Volumen).

---

Thermocycler-Bedingungen (für *GeneAmp-9600*, *Perkin Elmer*): 3min 30s 95°C (ein Zyklus); 30s 95°C, 30s 48°C, 60s 70°C (20 Zyklen); 30s 95°C, 60s 70°C (15 Zyklen).

Die PCR-Produkte der Einzelreaktionen wurden nach Kit-Anweisung aufgereinigt und anschließend in einem *ABI PRISM 377-Sequenzierautomaten* (*Perkin Elmer*) aufgetrennt und analysiert.

Das *ABI PRISM Dye Primer Kit* erlaubt in der Regel die Bestimmung einer Sequenz von maximal 500-700 Basen. Aufgrund der Länge der *Ccr2*- und *Ccr5*-cDNAs musste deshalb noch eine weitere Sequenzierungen mit internen Primern durchgeführt werden. Hierfür wurden die Primer *mccr2.int.for* und *mccr5.int.for* mit dem Programm *PRIMER* anhand der schon sequenzierten Abschnitte von *Ccr2* und *Ccr5* ausgewählt und bei *Life Technologies* bestellt.

<b>Primersequenzen</b>	
<b><i>mccr2.int.for</i>:</b>	5'-GCC AGG ACA GTT ACC TTT GG-3'
Position	490 509
<b><i>mccr5.int.for</i>:</b>	5'-AT GAG TGG GTC TTT GGG AAC-3'
Position	281 300

Für die interne Sequenzierung wurde das *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)* verwendet. Das Kit arbeitet statt mit *Dye Primern* mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs (*Dye Terminator*) in einem *Ready Reaction Mix*, der auch die *AmpliTaq-FS*-DNA-Polymerase enthält. Als Primer wurden *mccr2.int.for* und *mccr5.int.for* verwendet. Die Sequenzierreaktionen wurden nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

---

#### ***ABI PRISM Dye Terminator Reaktionsansatz***

<i>Ready Reaction Mix</i> (dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Puffer, <i>AmpliTaq-FS</i> ) ( <i>Perkin Elmer</i> )	8,0µl
interner Primer (6pmol/µl)	0,5µl
Plasmid-DNA (200ng/µl)	2,0µl
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	9,5µl
Volumen	20µl

Der Reaktionsansatz wurde mit 40µl Öl überschichtet.

Thermocycler-Bedingungen (für *Robocycler Gradient 96, Stratagene*): 2min 30s 94°C (ein Zyklus); 45s 94°C, 30s 50°C, 4min 15s 60°C (25 Zyklen).

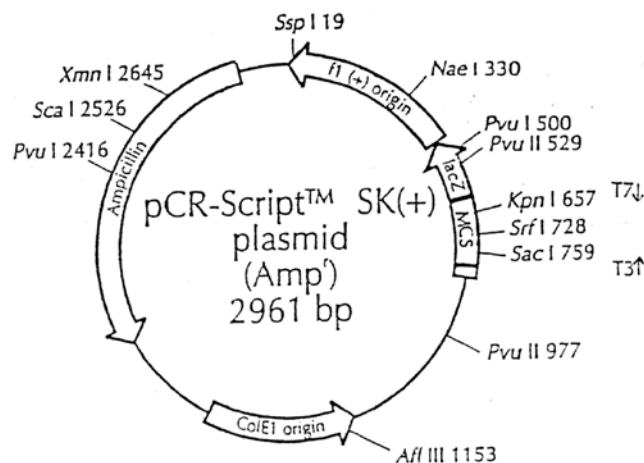
Die PCR-Produkte wurden nach Kit-Anweisung aufgereinigt und anschließend in einem *ABI PRISM 377*-Sequenzierautomaten aufgetrennt und analysiert.

Die Ergebnisse wurden graphisch in Form eines Elektropherogramms (s. Abb. 3-5) mit einem vierfarbigen Kurvenverlauf, entsprechend der Fluoreszenzsignale für die einzelnen Nukleotide, dargestellt. Die DNA-Sequenzdaten wurden aus der *ABI PRISM*-Software in das *GCG*-Format von *HUSAR* importiert und dort mit dem Programm *SEQUENCE EDITING AND MANIPULATION* editiert, zusammengestellt und gegebenenfalls korrigiert. Für die weiteren Sequenzanalysen wurden die Programme *BESTFIT*, *PAIR*, *GAP*, *MAPSORT*, *TRANSLATE* und *PEPLOT* aus dem Softwarepaket *HUSAR* verwendet.

## 2.3 KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

### 2.3.1 Der Plasmidvektor pCR-Script

*pCR-Script SK(+)* ist ein 2.961bp großes Plasmid, das sich von *pBluescript II SK(+)* ableitet und speziell für die Subklonierung von PCR-Fragmenten entwickelt worden ist. Als Selektionsmarker besitzt *pCR-Script* ein Ampicillin-Resistenzgen, das für  $\beta$ -Lactamase kodiert. Das  $\alpha$ -Fragment des *lacZ*-Gens ( $\alpha$ -Komplementation) mit eingefügtem Polylinker (*multiple cloning site*) erlaubt als Reportergen die Identifikation von rekombinanten Klonen.



**Abb. 2-1 Der Plasmidvektor *pCR-Script***

Die Plasmidkarte ist dem Katalog der Firma *Stratagene* entnommen.

*pCR-Script SK(+)* ist ein 2.961bp großes Plasmid. Es besitzt eine *multiple cloning site* (MCS) mit einer singulären *SrfI*-Schnittstelle (Position 728). Die MCS liegt im Reportergen *lacZ*. Als Selektionsmarker besitzt *pCR-Script* ein Ampicillin-Resistenzgen.

Die kodierenden Bereiche der murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 wurden aus genomischer Maus-DNA in einer Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Durch das Einfügen der kodierenden Sequenzen von Ccr2 bzw. Ccr5, einschließlich benötigter Restriktionsschnittstellen und optimaler Kozak-Sequenz, in den Plasmidvektor *pCR-Script* wurden die Plasmide *pmCCR2* und *pmCCR5* hergestellt. Hierfür wurden die PCR-Produkte in die singuläre *SrfI*-Schnittstelle (Position 728) der *multiple cloning site* von *pCR-Script* mit der *T4-DNA-Ligase* eingesetzt. Durch die Ligation eines DNA-Fragments wird die *SrfI*-Schnittstelle im *pCR-Script* zerstört. Durch die Zugabe von *SrfI* nach der Ligrationsreaktion wurden nur die nicht rekombinierten Plasmide wieder linearisiert, und hierdurch der Hintergrund an nicht rekombinanten Klonen nach Transformation in *E. coli* reduziert. Die Ligrationsprodukte wurden gefällt und in 20 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> gelöst.

### 2.3.2 Transformation von *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Verfahren für das Einschleusen von rekombinanter DNA in Bakterien angewendet: die Hitzeschock-Transformation und die Elektroporation. Voraussetzung für eine effiziente Transformation waren kompetente Bakterien. Es wurden die *dam*-Methylase-defizienten Laborstämme *E. coli SURE* und *E. coli DH5 $\alpha$*  (*Stratagene*) verwendet. Alle Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien waren steril.

#### Hitzeschock-Transformation

Bei der Hitzeschock-Transformation führt die rasche Temperaturänderung unter Anwesenheit von Calciumchlorid zu einer kurzfristigen Permeabilität der kompetenten *E. coli* für die rekombinierten Plasmide.

*Herstellung kompetenter Bakterien für die Hitzeschock-Transformation* (Nishimura et al. 1990):

2ml Medium-A (LB-Medium, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2% Glukose; sterilfiltriert) wurde mit einer Einzelkolonie von *E. coli* inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt (250rpm). Mit 0,5ml dieser Kultur wurde 50ml Medium-A (37°C) beimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 auf einem Schüttler (37°C, 250rpm) inkubiert. Anschließend wurde die 50ml-Kultur 10min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (10min, 4°C, 3000rpm; *Megafuge 1.0R*, *Heraeus*). Das Bakterienpellet wurde in 0,5ml eisgekühltem Medium-A resuspendiert und mit 2,5ml eisgekühltem Medium-B (LB-Medium, 12mM MgSO<sub>4</sub>, 12% Polyethylenglykol, 36% Glycerol; sterilfiltriert) vermischt. Die kompetenten Bakterien wurden in 100 $\mu$ l-Aliquots auf *Eppendorf*-Röhrchen verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

*Hitzeschock-Transformation*: Pro Transformationsansatz wurde ein 100 $\mu$ l-Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 $\mu$ l der in H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> gelösten Ligationsprodukte (ca. 50ng rekombinanter Plasmid-DNA) vermischt. Das Gemisch wurde 30min auf Eis inkubiert und anschließend für 60s in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten. Sofort nach dem „Hitzeschock“ wurden die Bakterien 2min auf Eis gekühlt und anschließend in 900 $\mu$ l SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM Glukose, pH 7,0) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde für 45min bei 37°C geschüttelt (250rpm), anschließend auf LB-Platten (LB-Medium, 1,5% Bacto-Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Plasmide *pCR-mCCR2* und *pCR-mCCR5* wurde jede LB-Platte zuvor mit je 100 $\mu$ l Ampicillin (50mg/ml), X-gal (2%) und IPTG (100mM) ausgestrichen. Für die Subklonierung der Expressionsvektoren *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5* wurden die LB-Platten mit 100 $\mu$ l Ampicillin (50mg/ml) ausgestrichen.

#### Transformation mittels Elektroporation

Bei der Transformation mittels Elektroporation wurden kompetente Bakterienzellen durch einen kurzen elektrischen Puls hoher Feldstärke kurzfristig permeabel für Plasmid-DNA gemacht (Dower et al. 1988). Hierbei kommt es zu einer Störung der Membranarchitektur und der Ausbildung transienter, für Makromoleküle durchlässiger Poren.

*Herstellung elektrokompetenter Bakterien:* 5ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* inokuliert und über Nacht bei 37°C mit 250rpm geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 2,5ml in 500ml LB-Medium gegeben und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 auf einem Schüttler (37°C, 250rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (10min, 2°C, 3000rpm; *Megafuge 1.0R*, *Heraeus*). Das Bakterienpellet wurde zweimal mit eisgekühltem, sterilem H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> gewaschen und abzentrifugiert (10min, 2°C, 3000rpm). Anschließend wurde es mit 40ml eisgekühltem 10% Glycerin gewaschen und abzentrifugiert (10min, 2°C, 3000rpm). Schließlich wurde das Bakterienpellet vorsichtig in ca. 1Vol eisgekühltem 10% Glycerin resuspendiert und unter Verwendung vorgekühlter Pipetten-spitzen und *Eppendorf*-Röhrchen in 50µl-Aliquots aufgeteilt. Diese wurden sofort in einem Ethanol/Trockeneisbad eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

*Elektroporation:* Pro Transformationsansatz wurde ein 50µl-Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1µl der in H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> gelösten Ligationsprodukte (ca. 50ng des Ligationsansatzes) vermischt. Das Gemisch wurde in eine sterilisierte, eisgekühlte Elektroporationsküvette (*Bio-Rad*) mit 2mm Spaltbreite überführt. Die Elektroporation wurde mit einem *GenePulser* der Firma *Bio-Rad* (1,8kV, Zeitkonstante ca. 5ms) durchgeführt. Sofort nach dem „Elektroschock“ wurden die Bakterien in 1,0ml SOC-Medium (Raumtemperatur) aufgenommen, in ein steriles 15ml-*Falcon*-Röhrchen überführt und für 60min bei 37°C geschüttelt (240rpm). Anschließend wurden geeignete Verdünnungen der Bakteriensuspension auf selektiven LB-Platten ausplattiert.

### 2.3.3 Identifizierung von rekombinanten Klonen

Durch Einsatz von Ampicillin wurden Bakterien selektiert, die das plasmidgebundene Ampicillin-Resistenzgen aufgenommen hatten. Das *lacZ*-Gen in *pCR-Script* erlaubte zusätzlich ein Blau-Weiß-Screening auf rekombinante Moleküle. Weiße Klone ließen auf ein Insert in der *multiple cloning site* des Vektors mit Unterbrechung des Leserasters im *lacZ*-Gen schließen. Positive Klone wurden durch Kontrollverdaue identifiziert und zum Ausschluss von Mutationen sequenziert. Die *Ccr2*- bzw. *Ccr5*-cDNA wurde mit *SalI* und *XbaI* aus den Plasmiden *pCR-mCCR2* bzw. *pCR-mCCR5* ausgeschnitten und anschließend gerichtet in den Expressionsvektor *pEF-DHFR* umkloniert.

## 2.4 TRANSFEKTION UND EUKARYONTISCHE PROTEINEXPRESSION

Für die Expression der murinen Chemokinrezeptoren *Ccr2* und *Ccr5* wurde die Dehydrofolatreduktase-defiziente *Chinese hamster ovary*-Zelllinie *CHO/dhFr<sup>-</sup>* (ATCC CRL-9096; Rockville, USA) verwendet (Urlaub und Chasin 1980).

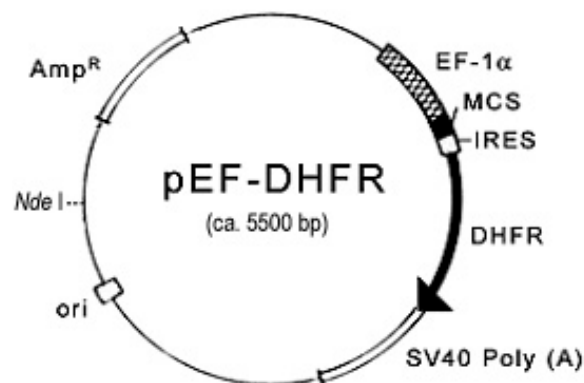


### 2.4.1 Kulturbedingungen der *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen

Die *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen wurden bei 37°C, 100% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen in angereichertem Vollmedium (*α-MEM-Medium*, *Life Technologies*; 2mM L-Glutamin, 10% dialysiertes FCS, 10µg/ml Adenosin, 10µg/ml Desoxyadenosin, 10µg/ml Thymidin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) kultiviert. Die Zellen sind aufgrund des Dehydrofolatreduktase-Enzymdefekts nicht in der Lage, Tetrahydrofolsäure, einen essentiellen Cofactor für die Übertragung von 1-Kohlenstoffresten, zu synthetisieren. Sie sind deshalb auf den Zusatz von Glycin, Thymidin und Adenosin angewiesen. Das Medium wurde alle vier Tage ersetzt. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 5min mit 3ml Trypsin/EDTA inkubiert. Nach Abnehmen des Trypsin/EDTAs wurden 5ml *α-MEM-Medium* zugegeben und die Zellen durch seitliches Klopfen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und vorsichtig auf- und abpipettiert. 0,5ml dieser Einzelzellsuspension wurden in ca. 5ml angereichertem *α-MEM*-Vollmedium ausgesät und weiter kultiviert.

### 2.4.2 Der Expressionsvektor *pEF-DHFR*

Um die *Ccr2*- bzw. die *Ccr5*-cDNA in CHO-Zellen zu exprimieren, wurde der bicistronische eukaryontische Expressionsvektor *pEF-DHFR* verwendet. Er leitet sich vom Vektor *pMT2PC* (Kaufman 1990; Mack et al. 1998) ab und wurde freundlicherweise von M. Mack zur Verfügung gestellt.



#### **Abb. 2-2** Der Expressionsvektor *pEF-DHF*

(Schematische Darstellung modifiziert nach Kaufman 1990 und Mack et al. 1998)

*pEF-DHFR* verfügt über eine bicistronische, eukaryontische Transkriptionseinheit, bestehend aus dem Promotor für den Elongationsfaktor *EF-1α*, gefolgt von einer *multiple cloning site (MCS)*, einer *internal ribosome entry site (IRES)*, dem *DHFR*-Gen und schließlich einem *SV40*-Polyadenylierungssignal. Für die Replikation in Bakterien trägt der Vektor das Ampicillin-Resistenzgen (*Amp<sup>R</sup>*) sowie einen bakteriellen Replikationsursprung (*ori*).

Die bicistronische Expression beruht auf einem gemeinsamen Promotor (*EF-1α*) für das Insert und das Enzym *DHFR* sowie einer *internal ribosome entry site (IRES)* zwischen den

beiden kodierenden Sequenzen (Kaufman et al. 1987; Pelletier und Sonenberg 1988). Die Transfektion von *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen mit *pEF-DHFR* erlaubte die Selektion transfizierter, DHFR-exprimierender Zellen in nukleosidfreiem Medium sowie ein Gen-Amplifikationsverfahren mit Methotrexat.

### 2.4.3 Transfektion von CHO-Zellen durch Elektroporation

Für die Elektroporation von CHO-Zellen wurden jeweils 100µg der CsCl-gereinigten Expressionskonstrukte *pEF-DHFR-mCCR2* und *pEF-DHFR-mCCR5* mit *NdeI* linearisiert. Anschließend wurden die linearisierten Vektoren phenolisiert, präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 800µl  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS steril aufgenommen. Die *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen wurden 2 Tage vor dem Transfektionsexperiment 1:10 *gesplittet* und in einer 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen (ca. 10<sup>7</sup>/Flasche) abgelöst, in 15ml-*Falcon*-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (3min, 1.600rpm; *Megafuge 1.0R*, *Heraeus*). Die Zellen wurden zweimal mit 5ml  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellpellets wurden jeweils in 800µl PBS-Lösung mit dem linearisierten Expressionskonstrukt resuspendiert, in eine Elektroporationsküvette (*Bio-Rad*) mit 4mm Spaltbreite überführt und 10min auf Eis gekühlt. Die Elektroporation erfolgte mit einem *GenePulser* der Firma *Bio-Rad* (260V, 960µF, Zeitkonstante ca. 20ms). Durch den kurzen elektrischen Puls hoher Feldstärke wurden die Zellen vorübergehend durchlässig für DNA gemacht. Der Verschluss der Poren wurde durch eine Inkubation der Zellen für weitere 10min auf Eis verzögert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 20ml angereichertem Vollmedium (*α-MEM-Medium*, 2mM L-Glutamin, 10% dialysiertes FCS, 10µg/ml Adenosin, 10µg/ml Desoxyadenosin, 10µg/ml Thymidin, 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) aufgenommen, in eine 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank (37°C, 100% Luftfeuchte, 5% CO<sub>2</sub>; *BB6220 CU*, *Heraeus*) inkubiert.

### 2.4.4 Selektion und Co-Amplifikation von transfizierten CHO-Zellen

#### Selektion erfolgreich transfizierter CHO-Zellen in nukleosidfreiem Selektivmedium

Nach 24h Inkubation wurden die Zellen 3x mit 20ml sterilem PBS gewaschen und das Vollmedium mit 20ml nukleosidfreiem Selektivmedium (nukleosidfreies *α-MEM-Medium*, 2mM L-Gluatamin, 10% dialysiertes FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) ersetzt. Unter diesen Bedingungen wurden mehrere Wochen erfolgreich transfizierte Zellen selektiert. Das Wachstum und die Zellmorphologie wurden regelmäßig unter dem Mikroskop (*Leitz Diavert*, *Leica*) kontrolliert. Die genomische Integration der *Ccr2*- bzw. *Ccr5*-Expressionskassette wurde mit PCR überprüft und die Oberflächenexpression von *Ccr2* bzw. *Ccr5* wurde in der Durchflusszytometrie untersucht.

### Gen-Amplifikation mit Methotrexat

Eine spezielle Anwendung des Expressionsvektors *pEF-DHFR* besteht in der Steigerung des Expressionsniveaus der transfizierten DNA-Sequenzen durch ein Gen-Amplifikationsverfahren (Kaufman und Sharp 1982). Es basiert auf der Inhibition der Dehydrofolatreduktase durch den Folsäure-Antagonisten Methotrexat (Mtx). Dies erlaubte die progressive Selektion von Zellen, die durch eine Amplifikation oder gesteigerte Expression des DHFR-Gens über mehrere Wochen bis Monate eine Resistenz gegen schrittweise erhöhte Mtx-Konzentrationen entwickeln (Schimke 1984). Aufgrund der bicistronischen Expressionsstrategie, bei der *Ccr2* bzw. *Ccr5* und das DHFR-Gen in einer gemeinsamen Transkriptionseinheit gekoppelt waren, kam es hierbei auch zu einer „Co-Amplifikation“ und Überexpression von *Ccr2* und *Ccr5* (Kaufman 1990).

Hierfür wurden die erfolgreich transfizierten CHO-Zellen nach Erreichen einer normalen Wachstumsgeschwindigkeit und Morphologie in nukleosidfreiem Selektionsmedium mit zusätzlich 20nM Mtx weiterkultiviert und bei Konfluenz 1:6 *gesplittet*. Das Wachstum und die Zellmorphologie wurden weiterhin regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach ca. 8-10 Wochen zeigten die transfizierten Zellen wieder eine nahezu normale Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit (Konfluenz innerhalb von 3 Tagen, 1:10 *gesplittet*). Ein zweiter Amplifikationsschritt mit 40nM und nach wenigen Wochen ein dritter Amplifikationsschritt mit 100nM Mtx wurde durchgeführt.

### Isolierung von Einzelzellklonen durch serielle Verdünnung

Da sich in der Massenkultur Zellpopulationen mit unterschiedlichem Expressionsniveau der transfizierten Chemokinrezeptoren fanden, wurden einzelne Zellen isoliert und diese wieder klonal expandiert. Hierzu wurden die Zellen abgelöst und eine aufsteigende Verdünnungsreihe (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000; 1:100.000; 1:1.000.000; 1:10.000.000; 1:100.000.000) der Zellsuspension hergestellt. Von jedem Verdünnungsschritt wurden 12 Microwells mit je 100µl der Zellsuspension auf einer 96-Microwell-Kulturplatte (*Nunc*) beladen. Unter dem Mikroskop wurde dann kontrolliert, bei welchem Verdünnungsschritt einzelne Zellen je *well* zu finden waren. In dieser Verdünnung wurden die Zellen dann auf eine neue 96-Microwell-Platte ausgesät und *wells* mit nur einer Zelle identifiziert und markiert. Diese „Einzelzell-Kulturen“ wurden weiter in 24-Microwell-Kulturplatten kultiviert, die Chemokinrezeptor-Expression in der Durchflusszytometrie kontrolliert und Klone mit der höchsten Rezeptorexpression weiter expandiert.

## **2.4.5 Einfrieren und Auftauen von CHO-Zellen**

### Einfrieren

Vor und nach den Selektions- und Amplifikationsschritten wurden jeweils mehrere Aliquots eingefroren. Hierfür wurden die transfizierten CHO-Zellen in Einfriermedium (Kulturmedium mit 9% DMSO) resuspendiert ( $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml) und steril auf 1,5ml-Kryoröhrchen (*Nunc*)

verteilt. In Einfrierbehältern (*Nalgene*) wurden sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht eingefroren und anschließend in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt und gelagert.

### Auftauen

Die im Flüssigstickstofftank (Gasphase) gelagerten Aliquots wurden im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut (30s-2min), das Kryoröhrchen außen mit 70% Ethanol desinfiziert und die aufgetaute Zellsuspension in einer sterilen Werkbank in ein 15ml-Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 10ml Kulturmedium gewaschen, abzentrifugiert (3min, 1000rpm; *Megafuge 1.0R*, *Heraeus*), in 20ml Kulturmedium resuspendiert und in einer  $75\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche ausgesät.

## 2.5 PROTEINNACHWEIS UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN

### 2.5.1 Herstellung polyklonaler Anti-Peptid-Immunsereen

Um die Expression der transfizierten cDNAs auf Proteinebene überprüfen zu können, wurden vor Beginn der Arbeit polyklonale Antiseren gegen Ccr2 und Ccr5 bei *Eurogentec* in Auftrag gegeben. Kaninchen waren hierfür mit künstlich synthetisierten Peptiden aus den N-terminalen Bereichen der veröffentlichten Ccr2- bzw. Ccr5-Sequenzen (Boring et al. 1996) nach Kopplung an KLH immunisiert worden.

<i>mCCR2-Peptid</i>	MEDNNMLPQFIHC	→ <i>Anti-mCCR2-Immunsereum (SA3141)</i>
<i>mCCR5-Peptid</i>	MDFQGSVPTYSDIDC	→ <i>Anti-mCCR5-Immunsereum (SA3143)</i>

Kaninchensereen waren vor (Präimmunsereum) und nach der mehrfachen Immunisierung (Immunsereum) gesammelt und in kleinen Aliquots eingefroren worden.

### 2.5.2 Immunoblotting (Western Blot)

Die in dieser Arbeit gezeigten Western Blots wurden zusammen mit S. Segerer aus unserer Arbeitsgruppe nach Standardprotokoll und Herstellerempfehlung durchgeführt. Hierfür wurden Proteingemische aus den untersuchten Zellen auf diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli 1970), in einer *Semidry-Blotting*-Apparatur auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern untersucht. Bei allen Arbeiten wurden Handschuhe getragen und die Membranen nur mit der Pinzette angefasst.

#### Präparation von Zelllysaten für Western Blots

Für die elektrophoretische Auftrennung der Zellproteine wurden die transfizierten CHO-Zellen lysiert, die Proteine denaturiert und ihre Disulfidbindungen gelöst. Nach dem Absaugen des Mediums wurden in 10cm-Zellkulturschalen konfluent gewachsene CHO-Zellen 3x mit je 20ml eisgekühltem PBS gewaschen. Dann wurden 0,5ml SDS-Auftragspuffer (50mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% SDS, 100mM DTT, 10% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau) auf

die Schale gegeben. Die entstehende visköse Mischung wurde in ein 1,5ml-*Eppendorf*-Röhrchen überführt, gut gemischt und 10min aufgeköcht. Das Lysat wurde wiederholt durch eine 23G-Kanüle aspiriert, dann abzentrifugiert (10min, 13.000rpm, *Biofuge 15, Heraeus*) und der Überstand (mit dem gelösten Proteingemisch) in ein frisches 1,5ml-*Eppendorf*-Röhrchen transferiert, auf Eis gestellt und das Pellet verworfen.

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

Zwischen zwei vertikale Glasplatten (Abstand 0,75mm) wurde ein 10%iges Polyacrylamid-Trenngel (3,3ml 30% Acrylamid, 2,5ml 1,5M Tris (pH 8,0), 0,1ml 10% SDS, 50µl APS, 4ml H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup>, 13µl TEMED) gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach ca. 60min war das Gel polymerisiert, und das Isobutanol wurde entfernt. Auf das Trenngel wurde dann ein 3%iges Polyacrylamid-Sammelgel (1ml 30% Acrylamid, 2,5ml 0,5M Tris (pH 6,8), 50µl APS, 6,4ml H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup>, 15µl TEMED) gegossen und ein Kamm für die Auftragstaschen eingesetzt. Das Polyacrylamidgel wurde im Elektrophoresesystem *Mini-Protean II (Bio-Rad)* vollständig mit SDS-Laufpuffer (25mM Tris/HCl (pH 8,3), 190mM Glycin, 0,1% SDS) bedeckt. Die Auftragstaschen wurden mit jeweils ca. 15µl der Proteinproben beladen. Die Vertikalelektrophorese erfolgte bei 200V, bis das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte (ca. 40min).

#### Elektroblotting

Sofort anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (*Immobilon-P, Millipore Corporation*) übertragen. Hierfür wurde die Membran zuerst 1-2s in 100% Methanol getaucht und für 15min in Transferpuffer (25mM Tris, 190mM Glycin, 20% Methanol) equilibriert. Dann wurde die Membran zusammen mit dem Acrylamidgel zwischen mehrere, mit Transferpuffer getränkte *Whatman-3MM* Filterpapiere gelegt und diese zwischen den Elektroden angeordnet. Das Elektroblotting wurde mit dem *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)* für 20min bei 15V (ca. 3mA/cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Durch eine reversible Ponceau-Rot-Färbung (5min in Ponceau S-Lösung) wurde der Protein-Transfer kontrolliert und die Positionen des *midrange* Proteinstandards (*Bio-Rad*) markiert.

#### Proteinnachweis mit Immunofärbung

Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% Magermilchpulver in TBST (10mM Tris-HCl (pH 8,0), 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) für 120min bei Raumtemperatur abgesättigt. Dann wurde die Membran mit dem Kaninchen *Anti-mCCR2-* bzw. *Anti-mCCR5-Immunserum* (1:1000 in TBS verdünnt) für 60min inkubiert. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran für 30min mit einem HRPO (*horseradisch peroxidase*)-gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper von *Amersham* (1:10.000 in TBS verdünnt) inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils 10min in TBST gewaschen. Die gebundene Peroxidase wurde mit dem *ECL-(enhanced chemiluminescence)*-Kit von *Amersham* nach Hersteller-Protokoll auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

### 2.5.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren zur Untersuchung fluoreszenzmarkierter Zellen anhand von Streulicht und Fluoreszenzintensitäten dar.

#### Zellvorbereitung

Konfluente CHO-Zellen wurden für die Durchflusszytometrie ohne Proteolyse der Oberflächenproteine abgelöst. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums mit 2ml 1mM EDTA in PBS (ohne Trypsin) inkubiert, bis sie sich abkugelten und durch seitliches Klopfen lösten. Die abgelösten Zellen wurden in 3ml RPMI-Medium aufgenommen, im Hemocytometer gezählt und abzentrifugiert (3min, 1000rpm; *Megafuge 1.0R, Heraeus*). Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium resuspendiert (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml), in 1ml Aliquots aufgeteilt und wieder abzentrifugiert (3min, 1000rpm; *Megafuge 1.0R, Heraeus*). Eine 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ergab ca. 16 Zellproben von je ca.  $5 \times 10^5$  Zellen.

#### Antikörpermarkierung

Das polyklonale *Anti-mCCR2-* bzw. *Anti-mCCR5-Immunserum* wurde als primärer Antikörper eingesetzt. Die Präimmunseren wurden als Negativkontrolle verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein kommerzieller FITC-markierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (*Dako*) benutzt.

Das CHO-Zellpellet (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen) wurde in 100µl eisgekühltem, 1:100 in RPMI-Medium verdünntem Immunserum oder Präimmunserum für 1h auf Eis inkubiert, alle 10min gut gemischt und anschließend abzentrifugiert (4°C, 3min, 1.600rpm). Um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde das Zellpellet zweimal mit 800µl eisgekühltem RPMI-Medium gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurde es mit 100µl FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-markiertem sekundärem Antikörper (eisgekühlt, 1:200 in RPMI-Medium verdünnt) gemischt, alle 10min gut geschüttelt und abschließend abzentrifugiert (4°C, 3min, 1.600rpm). Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch Waschen mit 800µl eisgekühltem PBS entfernt. Die markierten Zellen wurden in 300µl eisgekühltem PBS aufgenommen und bis zur Durchflusszytometrie lichtgeschützt auf Eis gelagert.

#### Durchführung der Durchflusszytometrie

Die einzelnen Zellproben wurden bis zur Analyse auf Eis gekühlt und direkt vor der Messung noch einmal gut resuspendiert. Die Durchflusszytometrie wurde an einem *Becton-Dickinson-FACScan* durchgeführt. Über ein Kapillarröhrchen wurden die Zellen angesaugt und einzeln an einem Argon-Ionen-Laserlichtstrahl mit 488nm Wellenlänge vorbeigeleitet. Mit Photodetektoren wurden das Vorwärtstreulicht (*FSC*; 0°-10°), das mit der Zellgröße korreliert, und das Seitwärtsstreulicht (*SSC*; 90°), das mit der Zellgranularität korreliert, gemessen. Durch Setzen von Akquisitionsfenstern (*gates*) im *FSC-SSC*-Histogramm ließ sich eine Analyse der gewünschten Zellpopulation einstellen. Zur Zellmarkierung wurde das Fluorochrom FITC mit einer Lichtemission von 525nm Wellenlänge verwendet und die FL-1 Werte (Lichtemission von +/- 530nm Wellenlänge) gemessen. Pro Analyse wurden Daten von

10.000 Zellen akquiriert und mit Hilfe der *CELLQUEST*-Software (*Becton-Dickinson*) ausgewertet. Die relative Fluoreszenzintensität (in %) wurde berechnet als:

$$100 \times \frac{\text{mittlere Fluoreszenzintensität (Chemokin)} - \text{mittlere Fluoreszenzintensität (Negativkontrolle)}}{\text{mittlere Fluoreszenzintensität (Medium)} - \text{mittlere Fluoreszenzintensität (Negativkontrolle)}}$$

Zur Untersuchung der Funktionalität und Spezifität der transfizierten Chemokinrezeptoren wurde die Liganden-induzierte Rezeptorinternalisierung im Durchflusszytometer untersucht. Die rekombinanten Chemokine Ccl2/mMCP-1 und Ccl5/mRANTES wurden von *R&D Systems* bezogen. CCL5/RANTES, AOP-RANTES und KS-vMIP-II wurden freundlicherweise von M. Mack zur Verfügung gestellt.

#### Liganden-induzierte Rezeptorinternalisierung

Um die konzentrationsabhängige Rezeptorinternalisierung zu untersuchen, wurden die transfizierten CHO-Zellen mit definierten Konzentrationen (2nM, 5nM, 10nM, 20nM, 40nM, 80nM, 120nM, 160nM, 200nM) der rekombinanten Chemokine in 100µl RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37°C für 45min inkubiert. Als Kontrolle wurde sowohl eine Inkubation mit der identischen Chemokinkonzentration bei 0°C als auch eine Inkubation ohne Chemokin (Negativkontrolle) durchgeführt. Um eine Aussage über die Zeitkinetik treffen zu können, wurde die Oberflächenexpression in einem weiteren Experiment zu den Zeitpunkten 5min, 10min, 20min, 30min, 60min, 90min und 120min untersucht. Die Rezeptorinternalisierung wurde beendet, indem die Zellen auf Eis abgekühlt, mit eisgekühltem PBS gewaschen und abzentrifugiert wurden (4°C, 3min, 1.600rpm).

#### Rezeptorrecycling

Um das Recycling der Chemokinrezeptoren an die Zelloberfläche zu untersuchen, wurden die transfizierten CHO-Zellen nach Inkubation mit Chemokin nicht sofort auf Eis abgekühlt, sondern stattdessen viermal mit RPMI-Medium gewaschen und anschließend in 800µl RPMI-Medium bei 37°C inkubiert (Zeitpunkt 0 des Recyclings). Die Oberflächenexpression wurde nach 5min, 10min, 20min, 30min, 40min, 60min, 90min, 120min und 180min im Durchflusszytometer untersucht. Das Rezeptorrecycling wurde wieder beendet, indem die Zellen auf Eis abgekühlt, mit eisgekühltem PBS gewaschen und abzentrifugiert wurden (4°C, 3min, 1.600rpm).

Die relative Oberflächenexpression und die Internalisierung bzw. das Recycling der transfizierten Chemokinrezeptoren wurden anhand der relativen Fluoreszenzintensität berechnet.

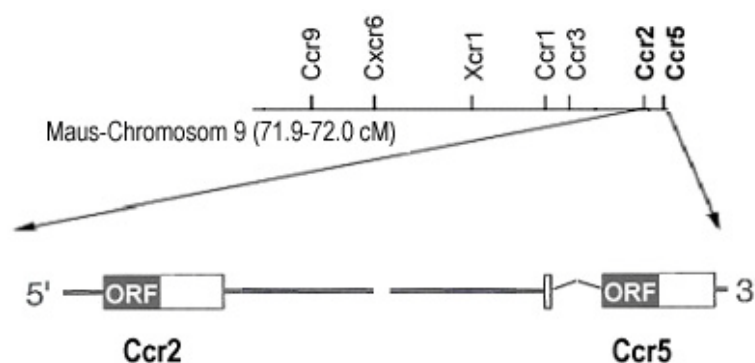
### 3 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit lagen für die murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 lediglich die cDNA-Sequenzen sowie erste Informationen über die mRNA-Expression vor. Aufgrund fehlender Antikörper existierten keine Daten über die Rezeptorexpression auf Proteinebene. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von zwei Zelllinien, die Ccr2 bzw. Ccr5 auf ihren Oberflächen überexprimieren. Hierfür wurden die kodierenden Sequenzen von Ccr2 und Ccr5 kloniert, Expressionskonstrukte hergestellt und CHO-Zellen stabil transfiziert. Der Erfolg wurde auf DNA, mRNA und Proteinebene kontrolliert. Die Zelloberflächenexpression und die Funktionalität der klonierten Rezeptoren wurden im Durchflusszytometer untersucht. Diese Zelllinien wurden in einer Folgearbeit für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Ccr2 und Ccr5 verwendet und dienten zudem als Werkzeug für eine weitere *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von Ccr2 und Ccr5.

#### 3.1 KLONIERUNG VON Ccr2 UND Ccr5

##### 3.1.1 Isolierung und Amplifikation der kodierenden Sequenzen von Ccr2 und Ccr5

Die Gene für die murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 liegen nebeneinander, in gleicher Orientierung auf Maus-Chromosom 9 (71.9-72.0 cM), synten der Lokalisation von CCR2 und CCR5 auf dem humanen Chromosom 3p21. Da sich die gesamte kodierende Sequenz von Ccr2 und Ccr5 jeweils auf einem einzigen Exon befindet, war es möglich, eine einfache PCR-Klonierungsstrategie anzuwenden.



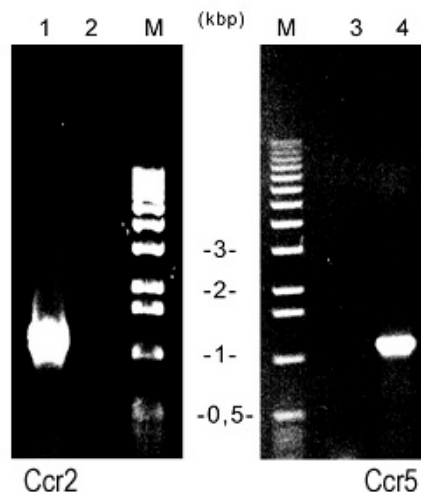
**Abb. 3-1 Organisation des murinen Ccr2- und Ccr5-Gens**

Die Gene von Ccr2 und Ccr5 liegen in der gleichen Orientierung, direkt nebeneinander, ca. 18kb voneinander entfernt auf Maus-Chromosom 9. Das Ccr2-Gen ist ca. 2,9kb lang. Die gesamte kodierende Sequenz (1122bp) und die 3'-UTR (*untranslated region*) liegen auf einem Exon. Ccr5 ist das letzte derzeit bekannte Gen auf Chromosom 9. Es ist ca. 5,6kb lang und besteht aus 2 Exons. Die 5'-UTR wird von einem ca. 2,6kb langen Intron unterbrochen. Auf Exon 2 liegt die gesamte kodierende Sequenz (1065bp) und die 3'-UTR von Ccr5.

(Abb. adaptiert nach [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) 2008)



Basierend auf den veröffentlichten cDNA-Sequenzen von Ccr2 (Boring et al. 1996) und Ccr5 (Boring et al. 1996; Meyer et al. 1996), wurden mit Computerunterstützung flankierende Primer mit hoher Bindungsspezifität und möglichst identischen Schmelzpunkten designt. Für die Umklonierung wurden an die Enden Restriktionsschnittstellen für *Xba*I (*forward*-Primer) bzw. *Sal*I (*reverse*-Primer) eingefügt. Für eine optimale Translation wurde in den *forward*-Primern vor das Start-Codon (ATG) ein Basentriplett (ACC) eingefügt, wodurch eine vollständige *Kozak-Sequenz* (5'-ACCATGG-3') generiert wurde. Mit Hilfe dieser Primerpaare (*mccr2.for/mccr2.rev* und *mccr5.for/mccr5.rev*) wurde jeweils der gesamte offene Leserahmen der murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 (1122bp) und Ccr5 (1065bp) einschließlich der eingefügten Restriktionsschnittstellen und *Kozak-Sequenz* in einer PCR mit *Pfu*-Polymerase aus genomischer Maus-DNA amplifiziert. Auf einem Agarosegel wurden die PCR-Produkte kontrolliert. Die amplifizierten DNA-Fragmente hatten die erwartete Größe von 1163bp für Ccr2 und 1095bp für Ccr5 (Abb. 3-2).



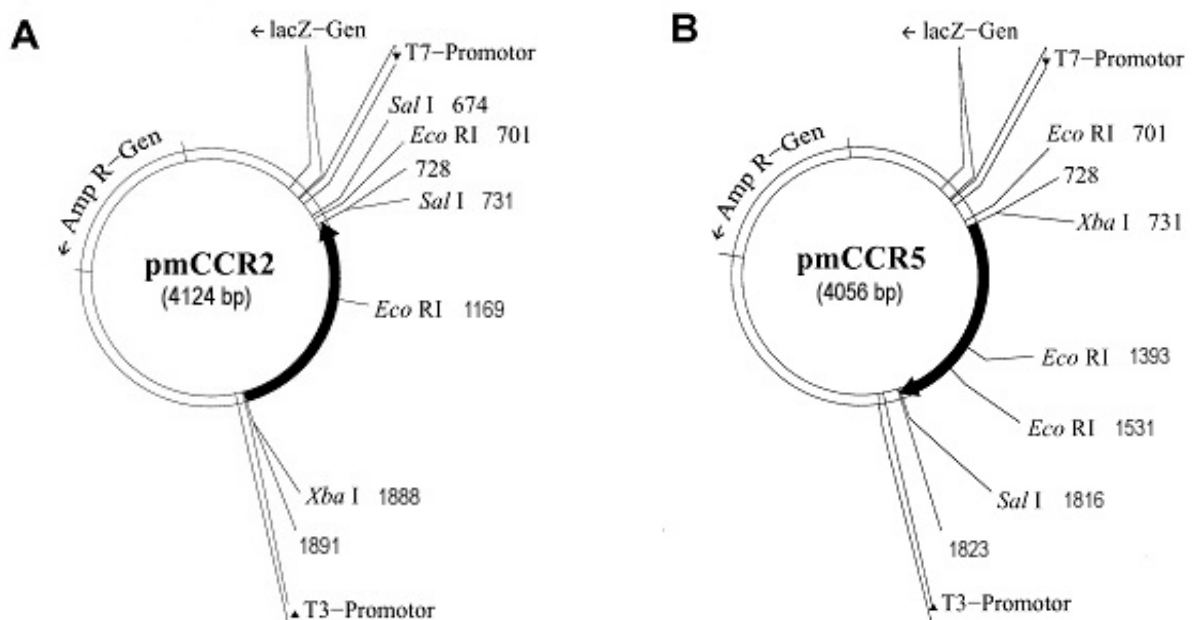
**Abb. 3-2 Amplifikation der kodierenden Sequenzen von Ccr2 und Ccr5 mit PCR**

Der gesamte kodierende Bereich der murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 wurde mit speziellen Primern aus genomischer Maus-DNA unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase in einer Polymerase-Kettenreaktion mit 35 Zyklen amplifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte auf 0,6%-Agarosegelen zeigt spezifische Banden der erwarteten Länge für Ccr2 (1163bp; Spur 1) und Ccr5 (1095bp; Spur 4). Spuren 2 und 3 zeigen die Negativkontrollen ohne Zugabe von DNA zum PCR-Ansatz. Längenstandard (M), 1kb-Leiter.

### 3.1.2 Subklonierung der kodierenden Sequenzen für Ccr2 und Ccr5 in Plasmidvektoren

Um die PCR-Produkte sequenzieren zu können, wurden die amplifizierten Ccr2- und Ccr5-Sequenzen in *E. coli* subkloniert. Hierzu wurde *pCR-Script Amp SK(+)*, ein 2961bp großes Plasmid, welches speziell für die Klonierung von PCR-amplifizierten Fragmenten entwickelt worden ist, verwendet. Es enthält als Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen ( $\beta$ -Lactamase), eine *multiple cloning site*, die von den T3- und T7-Promotorsequenzen flankiert wird, sowie ein *LacZ*-Reportergen ( $\beta$ -Galaktosidase) zur vereinfachten Identifikation

rekombinanter Klone. Die amplifizierte Ccr2- bzw. Ccr5-DNA-Fragmente wurde mit der *T4-DNA-Ligase* in die singuläre *SrfI*-Schnittstelle (728) der *multiple cloning site* (657-759) von *pCR-Script* ligiert. Hierdurch wurde die *SrfI*-Schnittstelle zerstört. Durch Zusatz von *SrfI* zu der Ligationsreaktion wurden Plasmide ohne ein Insert immer wieder linearisiert. Da die Transformationseffizienz zirkulärer Plasmide deutlich höher ist als die von linearen Plasmiden, wurde so der Hintergrund an nicht rekombinanten Klonen reduziert. Da sowohl *Pfu*-Polymerase als auch *SrfI* glatte Enden ergeben, war die Orientierung der Ccr2- bzw. Ccr5-Inserts zufällig. Mit dem im Insert asymmetrisch schneidenden Restriktionsenzym *EcoRI* konnte die Orientierung relativ zum Vektor bestimmt werden (Abb. 3-4B). Die Gesamtsequenz der Plasmidvektoren *pmCCR2* und *pmCCR5* wurde nach Sequenzierung der Ccr2- bzw. Ccr5-Inserts mit Hilfe des Softwarepakets *HUSAR* Version 5 erstellt. Abb. 3-3 zeigt die Restriktionskarten der Plasmide *pmCCR2* und *pmCCR5*.



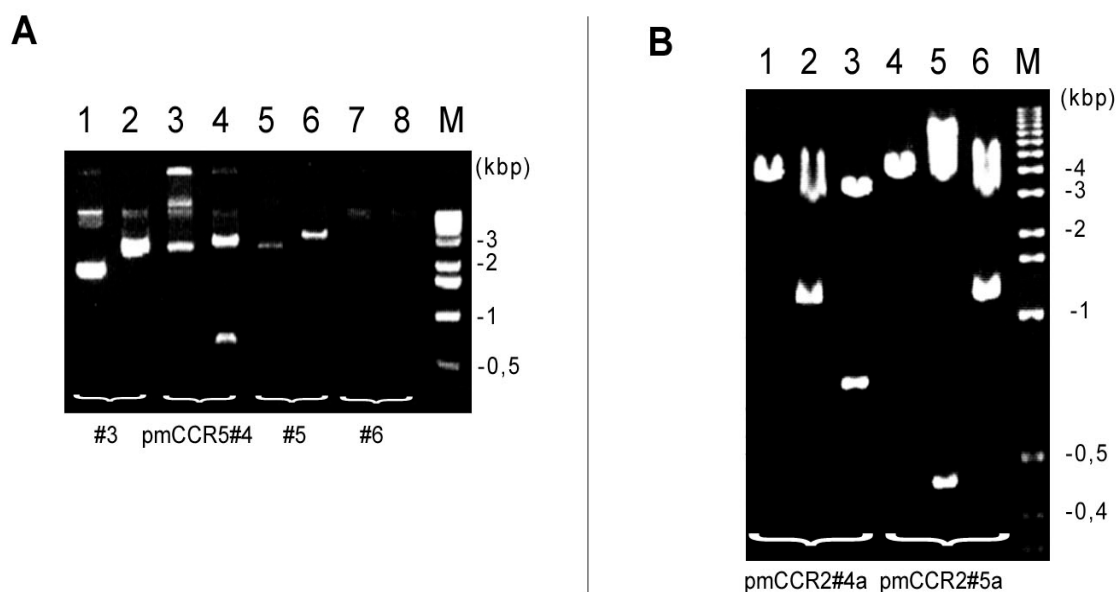
**Abb. 3-3** Karten der Plasmidvektoren *pmCCR2* (A) und *pmCCR5* (B)

Die rekombinanten Plasmide *pmCCR2* bzw. *pmCCR5* enthalten die Ccr2- bzw. Ccr5-Inserts (scharze Pfeile: Ccr2 1891-728; Ccr5 728-1822) mit der gesamten kodierenden Sequenz von Ccr2 (1122bp) bzw. Ccr5 (1095 bp) sowie die an den Enden eingefügten Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SalI*. Flankiert wurden sie von den T3- und T7-Promotorsequenzen. Die Orientierung der Inserts ergab sich aus dem Kontrollverdau mit *EcoRI*. Die Vektoren besitzen ein Ampicillin-Resistenzgen (*Amp<sup>R</sup>-Gen*) und das  $\alpha$ -Fragment des *lacZ*-Reportergens ( $\alpha$ -Komplementation des *lacZ*-Gens).

### 3.1.3 Transformation von *E. coli* mit *pmCCR2* und *pmCCR5*

Zum Einschleusen der Plasmide *pmCCR2* bzw. *pmCCR5* in *E. coli* wurde die Elektroporation eingesetzt. Hierfür wurden elektrokompente *E. coli SURE* mit dem Ligationsansatz gemischt und durch einen kurzen elektrischen Puls hoher Feldstärke kurzfristig permeabel für Plasmid-DNA gemacht. Nur transformierte Bakterien exprimierten  $\beta$ -Lactamase und konnten auf

Selektionsmedium mit Ampicillin überleben. Das *lacZ*-Reporter-gen erlaubte ein Blau-Weiß-Screening rekombinanter Plasmide. Bei blauen *E. coli*-Kolonien spaltete die  $\beta$ -Galactosidase (das Produkt des *lacZ*-Reporter-gens) das auf den Agarplatten ausplattierte X-gal in blaue Reaktionsprodukte. Weiße Kolonien zeigten an, dass das offene Leseraster des *lacZ*-Gens durch ein Insert in der *multiple cloning site* (MCS) von *pCR-Script* unterbrochen wurde. Es wurden jeweils etwa 10-20 weiße *E. coli*-Kolonien gepickt, 2ml Flüssigkulturen damit beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde Miniprep-DNA präpariert und Kontrollverdau mit Aliquots durchgeführt. So wurden sieben positive Klone für *pmCCR2* und zwei positive Klone für *pmCCR5* identifiziert.



**Abb. 3-4 Kontrollverdau der Miniprep-DNA einzelner *E. coli*-Klone nach Elektroporation**

**A:** *EcoRI*-Kontrollverdau von Plasmiden, die aus vier weißen *E. coli*-Kolonien (#3-#6), nach Transformation mit *pmCCR5* isoliert worden waren. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Nur der Klon pmCCR5#4 zeigt die erwarteten Banden von 3502bp und 692bp (Spur 4); das 138bp-Fragment ist auf dem Gel nicht zu erkennen.

- |   |                            |
|---|----------------------------|
| 1 | <u>Klon #3</u> ; unverdaut |
| 2 | Verdau mit <i>EcoRI</i>    |
| 3 | <u>Klon #4</u> ; unverdaut |
| 4 | Verdau mit <i>EcoRI</i>    |
| 5 | <u>Klon #5</u> ; unverdaut |
| 6 | Verdau mit <i>EcoRI</i>    |
| 7 | <u>Klon #6</u> ; unverdaut |
| 8 | Verdau mit <i>EcoRI</i>    |

M: 1kb-Leiter

**B:** Analytischer Verdau von Miniprep-DNA der zwei positiven Klone *pmCCR2#4a* (Spuren 1-3) und *pmCCR2#5a* (Spuren 4-6) mit *XbaI*, *XbaI/SalI* und *EcoRI* auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt. *EcoRI* schneidet im Insert asymmetrisch, so dass die unterschiedliche Orientierung des Inserts in den zwei Klonen sichtbar wird.

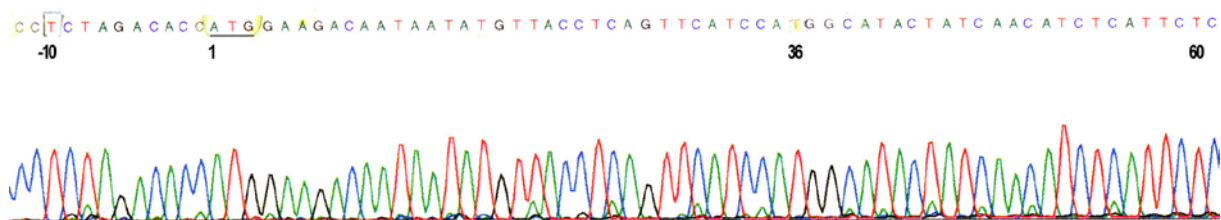
- |   |  |
|---|--|
| 1 | <i>XbaI</i> linearisiert <i>pmCCR2#4</i> (4124bp)  |
| 2 | <i>XbaI/SalI</i> schneidet die <i>Ccr2</i> -Sequenz (1157bp) aus dem Vektor (2910bp+57bp*)   |
| 3 | <i>EcoRI</i> schneidet <i>pmCCR2#4a</i> asymmetrisch im Insert und in der MCS (3375bp+749bp) |
| 4 | <i>XbaI</i> linearisiert <i>pmCCR2#5a</i> (4124bp)   |
| 5 | <i>EcoRI</i> schneidet <i>pmCCR2#5a</i> asymmetrisch im Insert und in der MCS (3656bp+468bp) |
| 6 | <i>XbaI/SalI</i> schneiden die <i>Ccr2</i> -Sequenz (1157bp) aus dem Vektor (2910bp+ 57bp)*  |

\* auf dem Gel nicht sichtbares Fragment (zstl. *SalI*-Schnittstelle im Polylinker)

Abb. 3-4A zeigt beispielhaft die Ergebnisse des Miniprep-Kontrollverdaus von vier weißen Klonen nach Elektroporation mit *pmCCR5*. *EcoRI* schneidet zweimal im Insert und einmal in der *multiple cloning site*. Der *E. coli*-Klon *pmCCR5#4* zeigte die erwarteten Banden von 3502bp und 692bp Größe (bei Orientierung des Inserts wie in Abb. 3-3B dargestellt). Ein 138bp großes Fragment war auf dem gezeigten 1% Agarosegel nicht mehr sichtbar. Abb. 3-4B zeigt beispielhaft den analytischen Verdau der zwei positiven Klone *pmCCR2#4a* und *pmCCR2#5a*. *XbaI* linearisiert *pmCCR2*, *XbaI/SalI* schneidet die klonierte *Ccr2*-Sequenz aus dem Vektor und *EcoRI* schneidet einmal asymmetrisch im Insert und einmal in der *multiple cloning site*. Die Fragmentlängen nach *EcoRI*-Verdau von *pmCCR2#5a* entsprechen der Orientierung des *Ccr2*-Inserts im Plasmidvektor wie in Abb. 3-3A dargestellt.

### 3.1.4 Sequenzierung und Analyse der klonierten *Ccr2*- und *Ccr5*-DNA-Fragmente

Um zu überprüfen, ob die klonierten *Ccr2*- und *Ccr5*-Sequenzen keine Mutationen enthalten, wurden die Inserts der im Kontrollverdau positiven Klone *pmCCR2#5a* und *pmCCR5#4* vor deren Weiterverwendung sequenziert. Die flankierenden T3- und T7-Promotersequenzen von *pCR-Script* erlaubten eine Ansequenzierung der Inserts von 5'-terminal und 3'-terminal mit fluoreszenzmarkierten T3- und T7-Primern des *ABI PRISM Dye Primer Sequencing-Kits*. Anhand der Elektropherogramme wurden die Sequenzen der einzelnen Sequenzierreaktionen sorgfältig überprüft. Abb. 3-5 zeigt ausschnittsweise den Anfang des Elektropherogramms der 5'-terminalen Sequenzierreaktion für das Insert *mCCR2#5a* aus dem Plasmid *pmCCR2* (Klon 5a). Der vierfarbige Kurvenverlauf zeigt die im Sequenzautomaten gemessenen Fluoreszenzsignale, wobei jede Farbe mit einer Base korreliert (blau: Cytosin; rot: Thymin; grün: Adenin; schwarz: Guanin). Bei dem gezeigten Abschnitt sind die einzelnen Basen eindeutig zu identifizieren. Ab etwa 400 Basen nahm die Trennschärfe zunehmend ab. Die einzelnen Sequenzierreaktionen lieferten jeweils eine Leseweite von 400-500 Basen.



**Abb. 3-5 Ausschnitt aus einem Elektropherogramm einer Sequenzierreaktion für *mCCR2#5a***

Der farbige Kurvenverlauf zeigt die im Sequenzautomaten gemessenen Fluoreszenzsignale, wobei jede Farbe mit einer Base korreliert (blau: Cytosin; rot: Thymin; grün: Adenin; schwarz: Guanin). Hieraus ergibt sich die darüberliegende Sequenz. Unterstrichen und mit 1 gekennzeichnet ist das Start-Codon (ATG). Auf Position 36 liegt im Unterschied zu den von Boring bzw. Kurihara veröffentlichten Sequenzen (*GenBank* U47035 bzw. U51717) eine stumme Mutation (Basenaustausch C→T) vor.

Aufgrund der Länge der klonierten Ccr2- und Ccr5-DNA-Fragmente blieb nach der Ansequenzierung von beiden Enden her noch ein interner Sequenzabschnitt, der so nicht ausreichend genau bestimmt werden konnte. Ausgehend von den schon sequenzierten Abschnitten wurden mit Hilfe des Programms *PRIMER* die internen Primer *mccr2.int.for* und *mccr5.int.for* ausgewählt. Unter Verwendung des *ABI PRISM Dye Terminator Sequencing-Kits* mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs gelang es, die Sequenzen der noch fehlenden DNA-Abschnitte vollständig zu bestimmen. Aus den Sequenzdaten der 5'-terminalen, 3'-terminalen und internen Sequenzierungen wurde jeweils die Gesamtsequenz für das klonierte Ccr2- bzw. Ccr5-DNA-Fragment mit Hilfe der Programme *SEQUENCEEDITING* und *BESTFIT* erstellt. Die so erhaltenen Sequenzen für Ccr2 und Ccr5 wurden mit den Programmen *BESTFIT*, *GAP*, *MAPSORT* und *TRANSLATE* weiter bearbeitet und die Gesamtsequenzen der Plasmide *pmCCR2* und *pmCCR5* erstellt. Mit diesen Daten konnten die Ergebnisse der Kontrollverdau noch einmal überprüft werden. Zudem wurden die Aminosäuresequenzen der klonierten Rezeptoren abgeleitet und die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen mit den veröffentlichten Sequenzen von Ccr2 und Ccr5 verglichen. Jede Abweichung von den veröffentlichten Sequenzen wurde nochmals genau im Elektropherogramm kontrolliert. Abb. 3-5 zeigt z.B. eine stumme Mutation (Basenaustausch C→T) an Position 36 im Vergleich zu den von Boring bzw. Kurihara veröffentlichten Ccr2-Sequenzen (*GenBank* U47035 bzw. U51717). Als zusätzliche Kontrolle wurden noch die Inserts der ebenfalls positiven *E. coli* Klone *pmCCR2#4a* und *pmCCR5#11* mit identischem Ergebnis sequenziert.

#### Sequenzanalyse von mCCR2#5a

Für das Insert *mCCR2#5a* aus dem Plasmid *pmCCR2* (Klon #5a) ergab sich in der Computergestützten Sequenzanalyse ein offenes Leseraster von 1119 Basenpaaren. Mit dem *HUSAR*-Programm *TRANSLATE* wurde die Aminosäuresequenz (373 Aminosäuren) abgeleitet. Die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz des klonierten Chemokinrezeptors Ccr2 ist in Abb. 3-6 zu sehen. Zusätzlich ist die Lokalisation der Rezeptordomänen eingezeichnet. Grau unterlegt sind die Positionen der Primer *mccr2.for*, *mccr2.int* und *mccr2.rev*. Hervorgehoben sind die Aminosäure-Austausche im Vergleich zu den veröffentlichten Ccr2-Sequenzen.

-12	CGT	↑	CTA	GAC	ACC	ATG	GAA	GAC	AAT	AAT	ATG	TTA	CCT	CAG	TTC	ATC	CAT	GGC	ATA	CTA	TCA	48	
1						M	E	D	N	N	M	L	P	Q	F	I	H	G	I	L	S	16	
						←-1- NH2-Terminus																	
49	ACA	TCT	CAT	TCT	CTA	TTT	ACA	CGA	AGT	ATC	CAA	GAG	CTT	GAT	GAA	GGG	GCC	ACC	ACA	CCG		108	
17	T	S	H	S	.	L	F	T	R	S	I	Q	E	L	D	.	E	G	A	T	T	P	36
109	TAT	GAC	TAC	GAT	GAT	GGT	GAG	CCT	TGT	CAT	AAA	ACC	AGT	GTG	AAG	CAA	ATT	GGA	GCT	TGG		168	
37	Y	D	Y	D	.	D	G	E	C	P	H	K	T	S	V	.	K	Q	I	G	A	W	56
																						55→←56-	
169	ATT	CTG	CCT	CCA	CTC	TAC	TCC	CTG	GTA	TTC	ATC	TTT	GGT	TTT	GTG	GGC	AAC	ATG	TTG	GTC		228	
57	I	L	P	P	.	L	Y	S	L	V	F	I	F	G	F	V	G	N	M	L	V	76	
						TMI																	

229	ATT ATA ATT CTG ATA GGC TGT AAA AAG CTG AAG AGC ATG ACT GAT ATC TAT CTG CTC AAC	288
77	I I I L . I G C K K L K S M T . D I Y L L N	96
	83 → ← 84 i1 93 → ← 94	
289	CTG GCC ATC TCT GAC CTG CTC TTC CTG CTC ACA TTA CCA TTC TGG GCT CAC TAT GCT GCA	348
97	L A I S . D L L F L L T L P F . W A H Y A A	116
	TMII 114 → ← 115	
349	AAT GAG TGG GTC TTT GGG AAT ATA ATG TGT AAA GTA TTC ACA GGG CTC TAT CAC ATT GGT	408
117	N E W V . F G N I M C K V F T . G L Y H I G	136
	e1 127 → ← 128 TMIII	
409	TAT TTT GGT GGA ATC TTT TTC ATT ATC CTC CTG ACA ATT GAT AGG TAC TTG GCT ATT GTT	468
137	Y F G G . I F F I I L L T I D . R Y L A I V	156
	149 → ← 150 i2	
	Primer <i>mccr2.int</i> →	
469	CAT GCT GTG TTT GCT TTA AAA GCC AGG ACA GTT ACC TTT GGG GTG ATA ACA AGT GTA GTC	528
157	H A V F . A L K A R T V T F G . V I T S V V	176
	166 → ← 167 TMIV	
529	ACT TGG GTG GTG GCT GTG TTT GCC TCT CTA CCA GGA ATC ATA TTT ACT AAA TCC AAA CAA	588
177	T W V V . A V F A S L P G I I . F T K S K Q	196
	191 → ← 192	
589	GAT GAT CAC CAT TAC ACC TGT GGC CCT TAT TTT ACA CAA CTA TGG AAG AAT TTC CAA ACA	648
197	D D H H . Y T C G P Y F T Q L . W K N F Q T	216
	e2	
649	ATA ATG AGA AAT ATC TTG AGC CTG ATC CTG CCT CTA CTT GTC ATG ATC ATC TGC TAC TCA	708
217	I M R N . I L S L I L P L L V . M I I C Y S	236
	219 → ← 220 TMV	
709	GGA ATT CTC CAC ACC CTG TTT CGC TGT AGG AAT GAG AAG AAG AGG CAC AGG GCT GTG AGG	768
237	G I L H . T L F R C R N E K K . R H R A V R	256
	239 → ← 240 i3 256 →	
769	CTC ATC TTT GCC ATC ATG ATT GTC TAC TTT CTC TTC TGG ACT CCA TAC AAT ATT GTT CTC TTC	831
257	L I F A . I M I V Y F L F W T . P Y N I V L F	277
	← 257 TMVI	
832	TTG ACC ACC TTC CAG GAA TCC TTG GGA ATG AGT AAC TGT GTG ATT GAC AAG CAC TTA GAC	891
278	L T T . F Q E S L G M S N C . V I D K H L D	297
	281 → ← 282 e3	
892	CAG GCC ATG CAG GTG ACA GAG ACT CTT GGA ATG ACA CAC TGC TGC ATT AAT CCT GTC ATT	951
298	Q A M . Q V T E T L G M T H . C C I N P V I	317
	298 → ← 299 TMVII	
952	TAT GCC TTT GTT GGA GAG AAG TTC CGA AGG TAT CTC TCC ATA TTT TTC AGA AAG CAC ATT	1011
318	Y A F . V G E K F R R Y L S . I F F R K H I	337
	322 → ← 323 COOH-Terminus	
1012	GCT AAA CGT CTC TGC AAA CAG TGC CCA GTT TTC TAT AGG GAG ACA GCA GAT CGA GTG AGC	1071
338	A K R . L C K Q C P V F Y R . E T A D R V S	357
	← Stop ← Primer <i>mccr2.rev</i> →	
1072	TCT ACA TTC ACT CCT TCC ACT GGG GAG CAA GAG GTC TCG GTT GGG TTG TAA AGT AAG TGA	1131
358	S T F . T P S T G E Q E V S . V G L *	373
	373 →	
	SalI	
1132	CAG TTT GCC TTT GTC GA ↑ C TG	1151

**Abb. 3-6 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *mCCR2#5a***

Dargestellt ist die gesamte Sequenz des *mCCR2*-Inserts (-12 bis 1151) mit den flankierenden Primern, einschließlich den Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Sal*I. Die kodierende Sequenz von *Ccr2* geht vom Startcodon (ATG, Position 1-3) bis zum Stoppcodon (TAA, Position 1120-1122). Direkt unter der Nukleinsäuresequenz steht die abgeleitete Aminosäuresequenz (1 bis 373). Die Lokalisation der Transmembran- (TM I-VII), extrazellulären (NH<sub>2</sub>-Terminus und e1-3) und intrazellulären (i1-3 und COOH-Terminus) Rezeptordomänen ist unterhalb der korrespondierenden Aminosäuren eingezeichnet. Die Cysteinreste C<sub>44</sub> und C<sub>290</sub> sowie C<sub>126</sub> und C<sub>203</sub> bilden interne Disulfidbrücken aus. Grau unterlegt sind die Positionen der Primer *mccr2.for*, *mccr2.int* und *mccr2.rev*. Ebenfalls hervorgehoben sind die Basen- und Aminosäureaustausche im Vergleich mit den von L. Boring (*GenBank* U47035) und T. Kurihara (U51717) veröffentlichten Sequenzen.

Im direkten Vergleich mit der von L. Boring aus einer cDNA-Bibliothek der murinen monozytären Zelllinie *WEHI 274.1* isolierten *Ccr2*-cDNA-Sequenz (*GenBank* U47035) fanden sich drei Basenaustausche, die in einem Fall auch zu einem Austausch einer Aminosäure ( $232_{\text{Val} \leftrightarrow \text{Ile}}$ ) in der V. Transmembrandomäne führte (Identität von 99,7% auf Nukleinsäure- und Proteinebene). Zu der von T. Kurihara und R. Bravo aus einer cDNA-Bibliothek der murinen monozytären Zelllinie *WEHI 265.1* isolierten *Ccr2*-cDNA (*GenBank* U51717) zeigte *mCCR2#5a* auf Nukleinsäureebene eine Identität von 99,5% (7 Basenaustausche) und auf Proteinebene eine Identität von 98,9% (4 Aminosäureaustausche:  $39_{\text{Gly} \leftrightarrow \text{Tyr}}$ ,  $184_{\text{Gly} \leftrightarrow \text{Ala}}$ ,  $232_{\text{Val} \leftrightarrow \text{Ile}}$ ,  $264_{\text{Gly} \leftrightarrow \text{Val}}$ ). In der Tabelle 3-1 sind die Punktmutationen in den verschiedenen *Ccr2*-Sequenzen, die zu Änderungen der Aminosäuresequenz führten, gegenübergestellt.

Basenaustausch	Aminosäureposition	Rezeptor-domäne	mCCR2#5a Simonis	U47035 Boring	U51717 Kurihara
115 (C↔T)	39	NH <sub>2</sub> -Terminus	Tyr (TAC)	Tyr	Gly* (CAC)
551 (G↔C)	184	TM IV	Ala (GCC)	Ala	Gly* (GGC)
694 (G↔A)	232	TM V	Ile (ATC)	Val* (GTC)	Val*
792 (G↔T)	264	TM VI	Val (GTC)	Val	Gly* (GGC)

**Tab. 3-1 Punktmutationen mit Aminosäure-Austauschen in den verschiedenen *Ccr2*-Sequenzen**

Zwischen *mCCR2#5a* und den veröffentlichten *Ccr2*-Sequenzen von L. Boring (*GenBank* U47035) und T. Kurihara (U51717) fanden sich 4 Punktmutationen (Spalte 1) mit Aminosäure-Austauschen ( $39_{\text{Gly} \leftrightarrow \text{Tyr}}$ ,  $184_{\text{Gly} \leftrightarrow \text{Ala}}$ ,  $232_{\text{Val} \leftrightarrow \text{Ile}}$ ,  $264_{\text{Gly} \leftrightarrow \text{Val}}$ ). Die von den Mutationen betroffenen Rezeptordomänen sind in Spalte 3 aufgelistet. Die Aminosäuren an den einzelnen variablen Positionen der unterschiedlichen *Ccr2*-Sequenzen sind tabellarisch aufgelistet und Veränderungen zu der Aminosäuresequenz von *mCCR2#5a* grau unterlegt und mit einem Stern hervorgehoben.

Anhand der Sequenzdaten und der abgeleiteten Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden, dass das klonierte DNA-Fragment die gesamte kodierende Sequenz von *Ccr2* enthält. Da der einzige Aminosäureaustausch ( $232_{\text{Val} \leftrightarrow \text{Ile}}$ ) zu der von L. Boring veröffentlichten *Ccr2*-Sequenz die einander ähnlichen, hydrophoben Aminosäuren Valin und Isoleucin betraf und die Mutation zudem im Bereich einer Transmembrandomäne lag, wurde keine wesentliche Veränderung in der Struktur und der Funktion dieses Chemokinrezeptors erwartet. Die minimale Abweichung von den veröffentlichten *Ccr2*-Sequenzen wurde als natürliche Variante interpretiert. Für die Herstellung einer *Ccr2*-überexprimierenden Zelllinie wurde daher das klonierte *mCCR2#5a*-DNA-Fragment weiterverwendet.

#### Sequenzanalyse von *mCCR5-1* und *mCCR5#4*

Die Sequenzanalyse des klonierten *Ccr5*-DNA-Fragments ergab ein komplexeres Bild. Es wird hier nur auf die Punktmutationen in den verschiedenen *Ccr5*-Sequenzen, die zu Änderungen der Aminosäuresequenz führen, eingegangen. Für das initial isolierte *Ccr5*-

DNA-Fragment (*mCCR5-1*) von dem Plasmid *pmCCR5-1* aus genomischer DNA einer Maus-Mesangialzelllinie fanden sich 11 Aminosäure-Abweichungen (Tab. 3-2) von der erstveröffentlichten Ccr5-Sequenz von L. Boring (*GenBank* U47036). Zwei dieser Mutationen (3<sub>Leu→Phe</sub>, 11<sub>Ile→Ser</sub>) befanden sich in dem *Ccr5-Peptid*, das für die Immunisierung von Kaninchen für die Herstellung von polyklonalem *Anti-mCCR5-Immuneserum* verwendet worden war, so dass Probleme bei der Detektion von Ccr5-Protein zu befürchten waren. Deshalb wurde die kodierende Sequenz des Ccr5-Gens nochmals neu kloniert. Als Ausgangsmaterial diente beim zweiten Anlauf genomische DNA, die aus einer Maus des Stammes *CD1* isoliert worden war.

Beide Sequenzen hatten in der Computer-gestützten Sequenzanalyse das erwartete offene Leseraster von 1065 Basenpaaren mit einer abgeleiteten Aminosäuresequenz mit 354 Aminosäuren. Abb. 3-7 zeigt die Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz des zweiten klonierten Ccr5-DNA-Fragments *mCCR5#4* von dem Plasmid *pmCCR5-2* (Klon #4) aus *CD1*-Maus-DNA. Hervorgehoben sind die vorhergesagte Lokalisation der Rezeptordomänen, die Positionen der Primer *mccr5.for*, *mccr5.int* und *mccr5.rev*. sowie die Aminosäure-Austausche im Vergleich mit den veröffentlichten Ccr5-Sequenzen.

12	CGT <sup>Xba I</sup> CTA GAC ACC ATG GAT CTT CAA GGG TCA GTT CCG ACC TAT AGC TAT GAC ATC GAT TAT	48
1	M D L Q G S V P T Y . S Y D I D Y	16
	←1 NH2-Terminus	
49	GGT ATG TCA GCA CCC TGC CAA AAA ATC AAT GTG AAA CAA ATT GCG GCT CAG CTC CTG CCC	108
17	G M S A . P C Q K I N V K Q I . A A Q L L P	36
	32 → ← 33	
109	CCA CTC TAC TCC CTG GTA TTC ATC TTT GGT TTT GTG GGT AAC ATG ATG GTC TTC CTC ATC	168
37	P L Y S . L V F I F G F V G N . M M V F L I	56
	TM I	
169	TTG ATA AGC TGC AAA AAG CTG AAG AGC CTG ACT GAT ATC TAC CTG CTC AAC CTG GCC ATC	228
57	L I S C . K K L K S V T D I Y . L L N L A I	76
	60 → ← 61 i1 70 → ← 71	
229	TCT GAC CTG CTC TTC CTG CTC ACA CTA CCA TTC TGG GCT CAC TAT GCT GCA AAT GAG TGG	288
77	S D L L . F L L T L P F W A H . Y A A N E W	96
	TM II 91 → ← 92 - internal Primer -	
289	GTC TTT GGG AAC ATA ATG TGT AAA GTA TTC ACA GGG CTC TAT CAC ATT GGT TAT TTT GGT	348
97	V F G N . I M C K V F T G L Y . H I G Y F G	116
	e1 104 → ← 105 TM III	
349	GGA ATC TTC TTC ATT ATC CTC CTG ACA ATT GAT AGG TAC TTG GCT ATT GTC CAT GCT GTG	408
117	G I F F . I I L L T I D R Y L . A I V H A V	136
	126 → ← 127 i2	
409	TTT GCT TTA AAA GTC AGA ACG GTC AAC TTT GGG GTG ATA ACA AGT GTA GTC ACT TGG GCG	468
137	F A L K . V R T V N F G V I T . S V V T W A	156
	143 → ← 144 TM IV	
469	GTG GCT GTG TTT GCC TCT CTC CCA GAA ATA ATC TTT ACC AGA TCT CAG AAA GAA GGT TTT	528
157	V A V F . A S L P E I I F T R . S Q K E G F	176
	168 → ← 169	
529	CAT TAT ACA TGC AGT CCT CAT TTT CCA CAC ACT CAG TAT CAT TTC TGG AAG AGT TTC CAA	588
177	H Y T C . S P H F P H T Q Y H . F W K S F Q	196
	e2	
589	ACA TTA AAG ATG GTC ATC TTG AGC CTG ATC CTG CCT CTA CTT GTC ATG GTC ATC TGC TAC	648
197	T L K M . V I L S L I L P L L . V M V I C Y	216
	200 → ← 201 TM V	



649	TCA GGA ATT CTC CAC ACC CTG TTT CGC TGT AGG AAT GAG AAG AAG AGG CAC AGG GCT GTG	708
217	S G I L . H T L F R C R N E K . K R H R A V	236
	-----220→←221----- i3 -----	
709	AGG CTC ATC TTT GCC ATC ATG ATT GTC TAC TTT CTC TTC TGG ACT CCC TAC AAC ATT GTC	768
237	R L I F . A I M I V Y F L F W . T P Y N I V	256
	237 →←238----- TMVI -----	
769	CTC CTC CTG ACC ACC TTC CAG GAA TTC TTT GGA CTG AAT AAC TGC AGT AGT TCT AAT AGA	828
257	L L L T . T F Q E F F G L N N . C S S S N R	276
	-----262→←263----- e3 -----	
829	CTA GAC CAG GCC ATG CAG GCA ACA GAG ACT CTT GGA ATG ACA CAC TGC TGC CTA AAC CCT	888
277	L D Q A . M Q A T E T L G M T . H C C L N P	296
	-----279→←280----- TM VII -----	
889	GTC ATC TAT GCC TTT GTT GGA GAG AAG TTC CGG AGT TAT CTC TCA GTG TTC TTC CGA AAA	948
297	V I Y A . F V G E K F R S Y L . S V F F R K	316
	-----303→←304-----	
949	CAC ATG GTC AAA CGC TTT TGC AAA CGG TGT TCA ATT TTC CAG CAA GAC AAT CCT GAT CGT	1008
317	H M V K . R F C K R C S I F Q . Q D N P D R	336
	----- COOH-Terminus -----	
1009	GCA AGC TCA GTC TAT ACC CGA TCC ACA GGA GAA CAT GAA GTT TCT ACT GGT TTA TGA	1065
337	A S S V . Y T R S T G E H E V . S T G L *	354
	-----354→-----	
	----- SalI -----	
1066	CCT GGT TGAC G↑T CGAC TG	1083

### Abb. 3-7 Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *mCCR5#4*

Aufgelistet ist die gesamte Sequenz des *mCCR5#4*-Inserts (-12 bis 1083) aus dem Plasmid *pmCCR5* (Klon #4), einschließlich der kodierenden Sequenz von Ccr5 (1-1065) sowie der flankierenden *mccr5*-Primer (grau unterlegt) mit den *Xba*I- und *Sal*I- Schnittstellen. Unter der Nukleinsäuresequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz (1 bis 354) dargestellt. Die Lokalisation der Transmembran- (TM I-VII), extrazellulären (NH<sub>2</sub>-Terminus und e1-3) und intrazellulären (i1-3 und COOH-Terminus) Rezeptordomänen ist unterhalb der korrespondierenden Aminosäuren eingezeichnet. Die Cysteinreste C<sub>22</sub> und C<sub>271</sub> sowie C<sub>103</sub> und C<sub>180</sub> bilden interne Disulfidbrücken aus. Hervorgehoben sind die Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch im Vergleich zu den veröffentlichten Ccr5-Sequenzen führen. (Nucleinsäure- und Aminosäure-Symbole im Anhang).

Ein Vergleich zwischen den von uns klonierten mit sieben weiteren, veröffentlichten Ccr5-Sequenzen ergab an 338 von 354 Aminosäurepositionen (95,5%) jeweils identische Aminosäuren. An insgesamt 13 Nukleinsäurepositionen fanden sich wiederkehrende *natural variants* mit Aminosäureaustauschen (3<sub>Leu↔Phe</sub>, 11<sub>Ser↔Ile</sub>, 62<sub>Lys↔Arg</sub>, 66<sub>Val↔Met</sub>, 97<sub>Val↔Ile</sub>, 109<sub>Leu↔Val</sub>, 156<sub>Ala↔Val</sub>, 160<sub>Phe↔Ser</sub>, 185<sub>Pro↔Leu</sub>, 208<sub>Pro↔Ser</sub>, 213<sub>Val↔Ile</sub>, 318<sub>Met↔Ile</sub>, 337<sub>Ala↔Val</sub>). An 3 verschiedenen Positionen fanden sich je nur einmal beschriebene Mutationen (80<sub>Leu↔Phe</sub>, 145<sub>Asn↔Ile</sub>, 190<sub>His↔Tyr</sub>). Tab. 3-2 gibt eine Übersicht der Punktmutationen mit Aminosäureaustauschen von Ccr5.

*mCCR5-1* und *mCCR5#4* unterschieden sich in 9 Aminosäuren. *mCCR5-1* war aber bis auf die 3<sub>Leu↔Phe</sub>-Mutation auf Proteinebene identisch mit der zweiten von S. Kuhmann veröffentlichten Ccr5-Sequenz (*GenBank* U83327) aus genomischer DNA einer murinen Zelllinie (ATCC *CRL-1658*). *mCCR5#4* unterschied sich wiederum nur in einer Aminosäure (3<sub>Leu↔Phe</sub>) von den zwei, auf Proteinebene identischen Ccr5-Sequenzen von S. Kuhmann (AF022990) aus einer *C57BL/6*-Maus und K. Kuno (D83648) aus mRNA einer murinen Makrophagenzelllinie. Von der Ccr5-Sequenz von L. Boring (U47036) unterschied sich

*mCCR5#4* nur in 2 Aminosäuren (3<sub>Leu→Phe</sub>, 208<sub>Pro→Ser</sub>). Eine Mutation (3<sub>Leu→Phe</sub>) lag aber noch im Bereich des *Ccr5*-Peptids, das für die Herstellung des *Anti-mCCR5*-Immunserums verwendet worden war.

Basenaustausch	AS	Rezeptor-domäne	mCCR5#4 Simonis	mCCR5-1 Simonis	Veröffentlichte Ccr5-Sequenzen (GenBank accession number und Autor)							
					U47036 Boring	X94151 Meyer	U68565 Kuziel	U83327 Kuhmann	AF022990 Kuhmann	AF019772 Doranz	D83648 Kuno	
7 (C↔T)	3	NH2-Terminus	Leu (CTT)	Leu	Phe* (TTT)	Leu	Phe*	Phe*	Phe*	Phe*	Phe*	Phe*
32 (G↔T)	11	NH2-Terminus	Ser (AGC)	Ile* (ATC)	Ser	Ile*	Ile*	Ile*	Ser	Ile*	Ser	Ser
185 (A↔G)	62	i 1	Lys (AAG)	Arg* (AGG)	Lys	Lys	Lys	Arg*	Lys	Lys	Lys	Lys
196 (G↔A)	66	i 1	Val (GTG)	Met* (ATG)	Val	Val	Val	Met*	Val	Val	Val	Val
238 (C↔T)	80	TM II	Leu (CTC)	Leu	Leu	Phe* (TTC)	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
289 (G↔A)	97	e 1	Val (GTC)	Val	Val	Ile* (ATC)	Ile*	Val	Val	Ile*	Val	Val
325 (C↔G)	109	TM III	Leu (CTC)	Val* (GTC)	Leu	Val*	Val*	Val*	Leu	Val*	Leu	Leu
434 (A↔T)	145	TM IV	Asn (AAC)	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Ile* (ATC)	Asn	Asn
467 (C↔T)	156	TM IV	Ala (GCG)	Val* (GIG)	Ala	Val*	Val*	Val*	Ala	Val*	Ala	Ala
479 (T↔C)	160	TM IV	Phe (TTT)	Ser* (TCT)	Phe	Phe	Phe	Ser*	Phe	Phe	Phe	Phe
554 (C↔T)	185	e 2	Pro (CCA)	Leu* (CIA)	Pro	Pro	Pro	Leu*	Pro	Pro	Pro	Pro
568 (C↔T)	190	e 2	His (CAT)	His	His	His	Tyr* (TAT)	His	His	His	His	His
622 (C↔T)	208	TM V	Pro (CCT)	Pro	Ser* (ICT)	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
637 (G↔A)	213	TM V	Val (GTC)	Ile* (ATC)	Val	Ile*	Ile*	Ile*	Val	Ile*	Val	Val
654 (G↔T)	318	COOH-Terminus	Met (ATG)	Ile* (ATJ)	Met	Ile*	Ile*	Ile*	Met	Ile*	Met	Met
1010 (C↔T)	337	COOH-Terminus	Ala (GCA)	Ala	Ala	Val* (GTA)	Val*	Ala	Ala	Val*	Ala	Ala

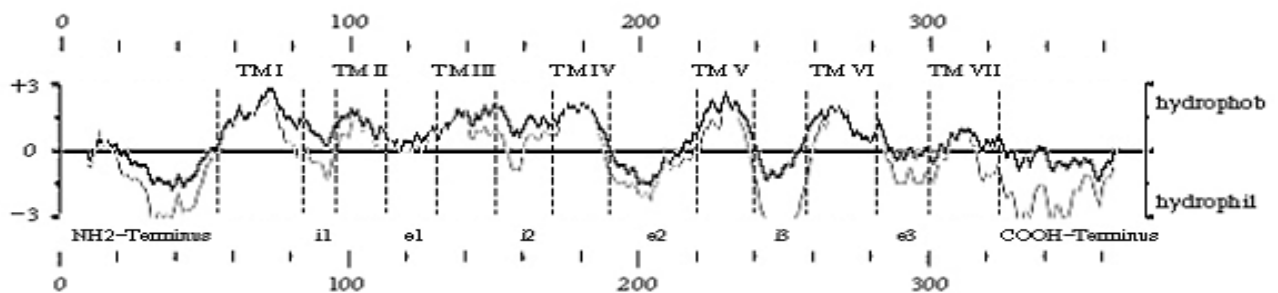
**Tab. 3-2 Punktmutationen mit Aminosäure-Austauschen von Ccr5**

Unter den verglichenen Ccr5-Sequenzen fanden sich an 16 Nukleinsäurepositionen (Spalte 1) Punktmutationen mit Aminosäure-Austauschen. Die von den Mutationen betroffenen Rezeptordomänen stehen in Spalte 3. Die Aminosäuren an den einzelnen variablen Positionen der unterschiedlichen Ccr5-Sequenzen sind tabellarisch aufgelistet. Veränderungen zu der Aminosäuresequenz von *mCCR5#4* sind grau unterlegt und mit Stern markiert.

Die Sequenzvergleiche machen deutlich, wie hoch die natürliche Variabilität im Ccr5-Gen ist. Höchstwahrscheinlich entsprechen auch die zwei klonierten Ccr5-DNA-Fragmente

natürlichen Varianten von Ccr5. Es wurde mit dem DNA-Fragment *mCCR5#4* weitergearbeitet.

Mit dem Programm *PEPLOT* (*HUSAR* Version 5) wurde anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone *mCCR2#5a* und *mCCR5#4* eine Hydropathie-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigten sich in guter Übereinstimmung mit dem bekannten Modell der G-Protein gekoppelten Rezeptoren sieben relativ hydrophobe Bereiche und acht relativ hydrophile Bereiche, die gut mit den vorhergesagten Positionen der einzelnen Rezeptordomänen für Ccr2 (*SWISS-PROT* P51683) bzw. Ccr5 (P51682) korrelieren. In Abbildung 3-8 ist das Ergebnis der Hydropathie-Analyse, einschließlich der Positionen der Rezeptordomänen für *mCCR2#5a*, graphisch dargestellt. Für Ccr5 ergab sich eine entsprechende Grafik (nicht gezeigt).



**Abb. 3-8** Plot der Hydropathie-Analyse der Aminosäuresequenz von *mCCR2#5a*

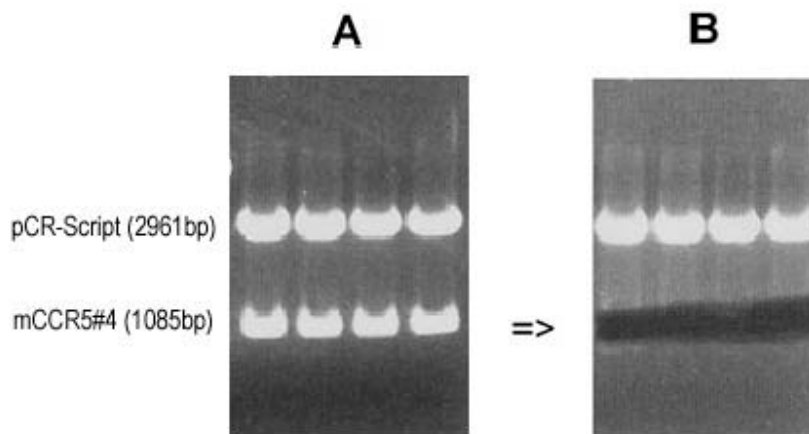
Plot und Hydropathie-Analyse wurden mit dem Programm *PEPLOT* (*HUSAR* Version 5) erstellt. Zusätzlich eingezeichnet sind die vorhergesagten Positionen der hydrophoben Transmembrandomänen (TM I-VII) sowie der hydrophilen extrazellulären Domänen (NH<sub>2</sub>-Terminus und e1-3) und intrazellulären Domänen (COOH-Terminus und i1-3) von Ccr2.

### 3.2 HERSTELLUNG DER ZELLINIEN *CHO-mCCR2* UND *CHO-mCCR5*

Um die klonierten murinen Chemokinrezeptorsequenzen für Ccr2 und Ccr5 in eukaryontischen Zellen exprimieren zu können, wurden sie in dem Expressionsvektor *pEF-DHFR* subkloniert. Nach Transformation von *E. coli* und anschließender Präparation der Plasmide, wurden CHO-Zellen mit den Ccr2- bzw. Ccr5-Expressionskonstrukten transfiziert.

### 3.2.1 Die Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5*

Als eukaryontischer Expressionsvektor wurde *pEF-DHFR* ausgewählt. Dieses Plasmid verfügt über eine bicistronische Transkriptionseinheit, bestehend aus dem gemeinsamen Promotor *EF-1 $\alpha$* , einer *multiple cloning site (MCS)* für die Aufnahme des zu exprimierenden Gens, einer *internal ribosome entry site (IRES)*, dem Dehydrofolatreduktase (*DHFR*) Gen und schließlich einem *SV40*-Polyadenylierungssignal. Für die Vermehrung in Bakterien besitzt der Plasmidvektor einen bakteriellen Replikationsursprung (*ori*) sowie ein Ampicillin-Resistenzgen (*Amp<sup>R</sup>*). Für die Herstellung der Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5* mussten die Ccr2- und Ccr5-Sequenzen aus den Plasmiden *pmCCR2* bzw. *pmCCR5* in den eukaryontischen Expressionsvektor *pEF-DHFR* umkloniert werden. Hierzu wurden die *E. coli*-Klone *mCCR2#5a* und *mCCR5#4* in 50ml Flüssigkultur expandiert und die Plasmide *pmCCR2* und *pmCCR5* isoliert und aufgereinigt. Die Expressionskassetten von Ccr2 und Ccr5 wurden mit *XbaI* und *SalI* aus *pmCCR2* bzw. *pmCCR5* herausgeschnitten und auf einem *low melting* Agarosegel aufgetrennt. Die Ccr2- bzw. Ccr5-Banden wurden dann auf einem langwelligen UV-Transiluminator sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend aus der *low melting* Agarose isoliert und aufgereinigt.



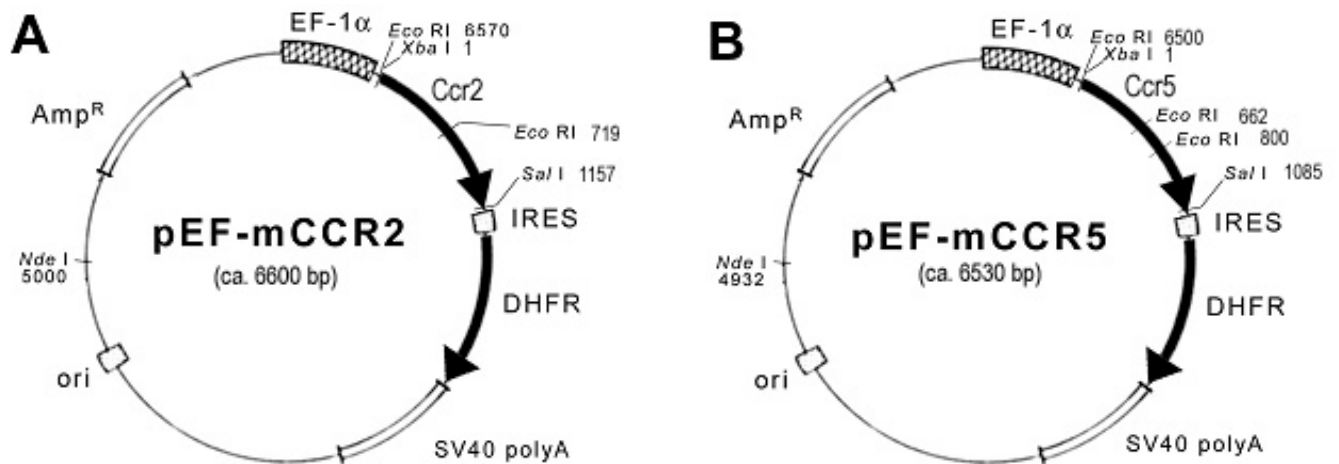
**Abb. 3-9 Isolierung des *mCCR5#4*-Inserts (Ccr5-Expressionskassette) aus dem Plasmid *pmCCR5***

**A** Die Ccr5-Expressionskassette wurde mit *XbaI/SalI* aus dem Vektor *pmCCR5* herausgeschnitten und auf einem 0,8% präparativen *low melting* Gel aufgetrennt. Es zeigen sich die Banden für das lineare Plasmid *pCR-Script* (2961bp) und das herausgeschnittene Insert *mCCR5#4* (1085bp).

**B** Auf einem UV-Transiluminator wurden die *mCCR5#4*-Banden sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die so isolierten DNA-Fragmente *mCCR2#5a* und *mCCR5#4* wurden mit Hilfe der *T4-DNA Ligase* gerichtet in die *multiple cloning site* des ebenfalls mit *XbaI/SalI* geschnittenen

Expressionsvektors *pEF-DHFR* ligiert. Abb. 3-10 zeigt die Plasmidkarten der daraus resultierenden Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5*.



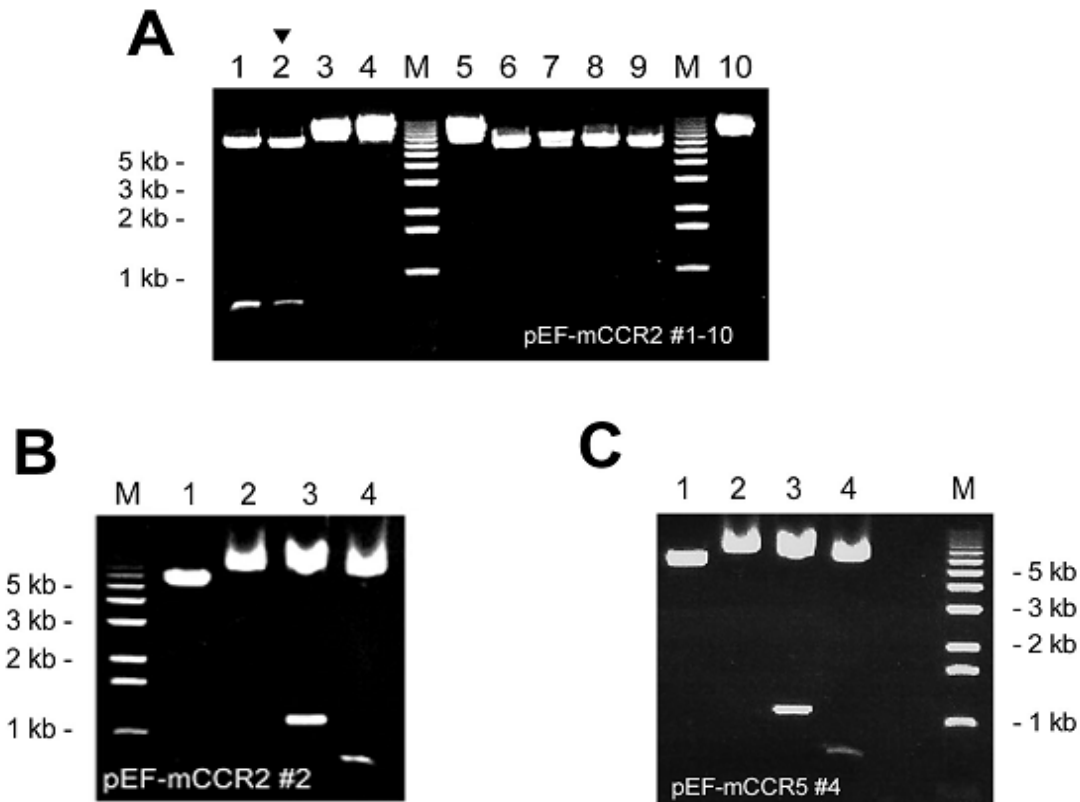
**Abb. 3-10** Karte der eukaryontischen Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5* (Schematische Darstellung modifiziert nach Kaufman 1990 und Mack et al. 1998)

Durch die gerichtete Insertion der kodierenden Sequenzen von Ccr2 bzw. Ccr5 in die *Xba*I/*Sal*I-Schnittstellen von *pEF-DHFR* wurden die eukaryontischen Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* (A) und *pEF-mCCR5* (B) hergestellt.

### 3.2.2 Transformation von *E. coli* mit *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5*

Die Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5* wurden durch Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Bakterien eingeschleust. Positive Einzelkolonien wurden in 2ml Flüssigkulturen vermehrt, und die Plasmid-DNA wurde isoliert. Mit dem Programm *MAPSORT* aus dem Softwarepaket *HUSAR* wurden die genauen Positionen der Restriktionsschnittstellen und damit Anzahl und Größe der erwarteten Fragmente anhand der Sequenzdaten von *mCCR2#5a* bzw. *mCCR5#4* bestimmt. In Kontrollverdauen wurde nach erfolgreich transformierten Klonen mit Insert gesucht. Eine Transformation durch Elektroporation war initial wiederholt ohne Erfolg versucht worden. Abb. 3-11A zeigt exemplarisch die Produkte einiger analytischer Restriktionsverdau mit *Eco*RI nach Transformation mit *pEF-mCCR2*. Die Spuren 1 und 2 zeigen Banden der erwarteten Größe (752bp und 5848bp) bei den erfolgreich durch Hitzeschock transformierten *E. coli*-Klonen *pEFmCCR2#1* und *#2*. Nach Elektroporation konnten im Kontrollverdau die erwarteten Restriktionsfragmente nicht nachgewiesen werden (Spuren 3 bis 10). Abb. 3-11B und C

zeigen weitere analytische Kontrollverdaue der positiven Klone *pEF-mCCR2#2* und *pEF-mCCR5#4* mit *NdeI*, *XbaI/SalI* sowie *EcoRI*.



**Abb. 3-11 Analytische Restriktionsverdaue von *pEF-mCCR2*- und *pEF-mCCR5*-Miniprep-DNA**

**A:** Kontrollverdaue mit *EcoRI* von Miniprep-DNA nach Hitzeschock-Transformation (Banden 1 und 2) bzw. nach Elektroporation (Banden 3-10) mit *pEF-mCCR2*, aufgetrennt auf 0,6% Agarosegel.

- 1 *pEF-mCCR2* #1, Nachweis der erwarteten *EcoRI*-Fragmente (749bp + ca. 5850bp).
- 2 *pEF-mCCR2* #2, Nachweis der erwarteten *EcoRI*-Fragmente (749bp + ca. 5850bp).
- 3-10 Nach Elektroporation zeigen sich bei keinem Klon Restriktionsfragmente der erwarteten Länge.

**B:** Analytischer Verdaue der Miniprep-DNA des Klons *pEF-mCCR2#2*, aufgetrennt auf 0,6% Agarosegel.

- 1 unverdaue
- 2 *NdeI* linearisiert *pEF-mCCR2* (ca. 6600bp)
- 3 *XbaI/SalI* schneidet die kodierende Sequenz von *Ccr2* aus *pEF-mCCR2#2* (1157bp + ca. 5450bp)
- 4 *EcoRI* generiert zwei Fragmente (749bp + ca. 5850bp)

**C:** Analytischer Verdaue der Miniprep-DNA von *pEF-mCCR5#4*, aufgetrennt auf einem 0,6% Agarosegel.

- 1 unverdaue
- 2 *NdeI* linearisiert *pEF-mCCR5* (ca. 6530bp)
- 3 *XbaI/SalI* schneidet die kodierende Sequenz von *Ccr5* aus *pEF-mCCR5#4* heraus (1085bp + ca. 5450bp)
- 4 *EcoRI* generiert drei Fragmente (138bp (auf dem Gel nicht sichtbar) + 692bp + ca. 5700bp)

M 1kb-Leiter

Die positiven *E. coli*-Klone *pEF-mCCR2#2* und *pEF-mCCR5#4* wurden in 50ml Flüssigkulturen expandiert. Anschließend wurden die Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-*

*mCCR5* für die Transfektion von CHO-Zellen in ausreichender Menge isoliert und aufgereinigt.

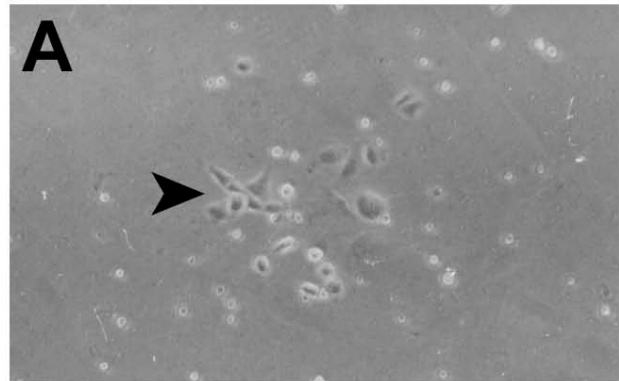
### 3.2.3 Transfektion von *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen mit *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5*

CHO-Zellen wurden schon von einigen Arbeitsgruppen erfolgreich für die Expression und Charakterisierung von Chemokinrezeptoren verwendet (Samson et al. 1996a; Nibbs et al. 1997; Mack et al. 1998). Für die funktionelle Expression von Ccr2 und Ccr5 wurde die Dehydrofolatreduktase-defiziente Zelllinie *CHO/dhFr<sup>-</sup>* (ATCC, CRL-9096) ausgewählt. Sie erlaubte neben der Selektion transfizierter Zellen in nukleosidfreiem Medium auch eine Gen-Amplifikation mit Methotrexat. Zum Einschleusen der Expressionskonstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5* in CHO-Zellen wurde die Elektroporation verwendet. Um eine Integration der Expressionskonstrukte in das Genom der CHO-Zellen und damit eine stabile Transfektion zu erreichen, wurden die Konstrukte *pEF-mCCR2* und *pEF-mCCR5* vor der Elektroporation linearisiert. Anschließend wurden die *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen mit den aufgereinigten und linearisierten Expressionskonstrukten inkubiert und durch Elektroporation transfiziert. Nur transfizierte Zellen besaßen das für die Thymidin- und Purin-Synthese essentielle Enzym Dehydrofolatreduktase (DHFR) und waren damit in der Lage, unter Selektionsbedingungen zu überleben. Unter dem Mikroskop konnte man sehen, wie sich einzelne adhärenente Foci mit sich teilenden, vermutlich erfolgreich transfizierten Zellen bildeten (Abb. 3-12A). Diese Zellen wurden unter sterilen Bedingungen als Massenkultur mehrere Wochen in Selektionsmedium kultiviert, bis wieder eine annähernd normale Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit erreicht worden war. Per Durchflusszytometrie wurde die Expression der transfizierten Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 auf der Oberfläche der transfizierten CHO-Zellen untersucht.

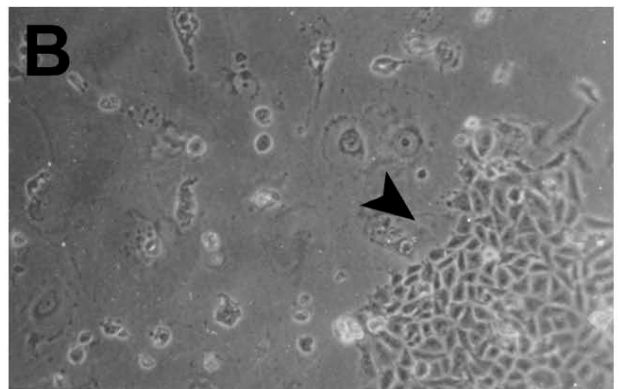
Aufgrund heterogener Zellpopulationen mit unterschiedlichen Expressionsniveaus der transfizierten Chemokinrezeptoren wurden Einzelzellen isoliert und klonal expandiert. Die Expression von Ccr2 und Ccr5 auf der Oberfläche dieser „Einzelzell-Kulturen“ wurde dann wieder durchflusszytometrisch untersucht. Die Klone mit dem höchsten Expressionsniveau wurden dann weiter expandiert und verwendet. Um eine weitere Steigerung der Ccr2- und Ccr5-Expression zu erreichen, wurde noch ein schrittweises Gen-Amplifikationsverfahren mit Methotrexat eingesetzt.

**Abb. 3-12** Mikrofotografien transfizierter *CHO-mCCR2*- und *CHO-mCCR5*-Zellen**A: *CHO-mCCR2*-Zellen (x100),  
72h nach Transfektion**

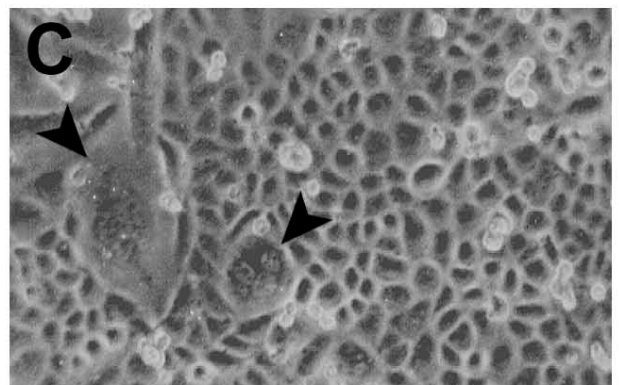
Die meisten Zellen starben im nukleosidfreien Selektionsmedium ab. Abgebildet ist ein kleiner Focus (Pfeilspitze), der sich vermutlich aus einer erfolgreich transfizierten Einzelzelle entwickelt hat.

**B: *CHO-mCCR2*-Zellen (x100),  
6d nach Transfektion**

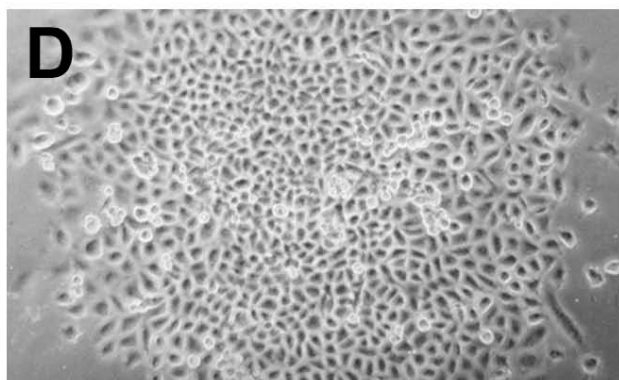
Nach 6 Tagen in nukleosidfreiem Medium waren die Foci durch wiederholte Zellteilungen deutlich gewachsen. Die Pfeilspitze zeigt auf einen solchen Focus.

**C: *CHO-mCCR2*-Massenkultur (x200)  
nach 4 Wochen in 20nM Mtx**

Unter dem verstärkten Selektionsdruck mit Mtx lösten sich anfangs eine Vielzahl von Zellen ab. Es zeigten sich viele Riesenzellen mit auffällig veränderter Morphologie (Pfeilspitzen). Die Zellteilungsrate hatte deutlich abgenommen. Im weiteren Verlauf normalisierten sich aber Wachstumsgeschwindigkeit und Zellmorphologie wieder.

**D: *CHO-mCCR5*-Einzelzellkultur (x100)  
in 24-well-plate in 20nM Mtx**

Aufgrund heterogener Expressionsniveaus in der Massenkultur wurden Einzelzellen isoliert und als „Einzelzell-Kulturen“ in kleinen 24-well-plate Kulturschalen gezüchtet.



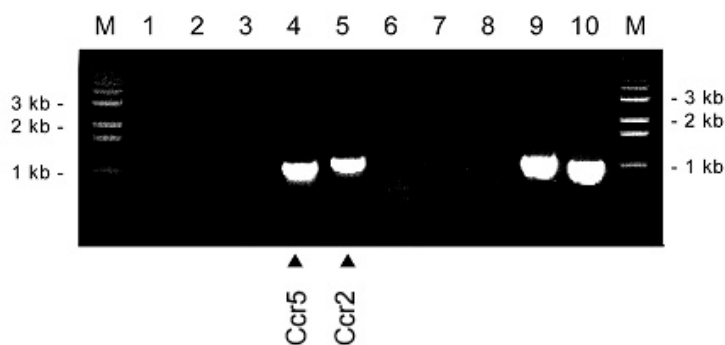


### 3.3 KONTROLLE DER GENOMISCHEN INTEGRATION, TRANSKRIPTION UND OBERFLÄCHEN-EXPRESSION VON Ccr2 UND Ccr5 IN STABIL TRANSFIZIERTEN CHO-ZELLEN

Um den Erfolg der stabilen Transfektion zu kontrollieren, wurde die Integration der Ccr2- und Ccr5-Sequenzen ins Genom der CHO-Zellen durch PCR überprüft. Die Transkription der Ccr2- bzw. Ccr5-Expressionskassette wurde durch RT-PCR überprüft. Im Western Blot und anschließend in der Durchflusszytometrie wurde die Proteinexpression und zelluläre Lokalisation untersucht.

#### 3.3.1 Nachweis der genomischen Integration der Ccr2- bzw. Ccr5-Expressionskassette

Der Einbau der Ccr2- bzw. Ccr5-Expressionskonstrukte in das Genom der transfizierten CHO/*dhFr*<sup>-</sup>-Zellen wurde durch PCR überprüft. Hierzu wurde die genomische DNA von CHO-*mCCR2*- und CHO-*mCCR5*-Zellen isoliert und eine PCR mit den Primern *mccr2.for/mccr2.rev* bzw. *mccr5.for/mccr5.rev* durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-13 abgebildet. Es zeigte sich eine spezifische Bande der erwarteten Länge für Ccr2 (1163 bp, Spur 5) wie auch für Ccr5 (1095 bp, Spur 4).



**Abb. 3-13 PCR mit genomischer DNA aus CHO-*mCCR2*- und CHO-*mCCR5*-Zellen**

PCR-Produkte auf 0,6% Agarosegel aufgetrennt zeigt spezifische Banden der erwarteten Längen für Ccr2 und Ccr5.

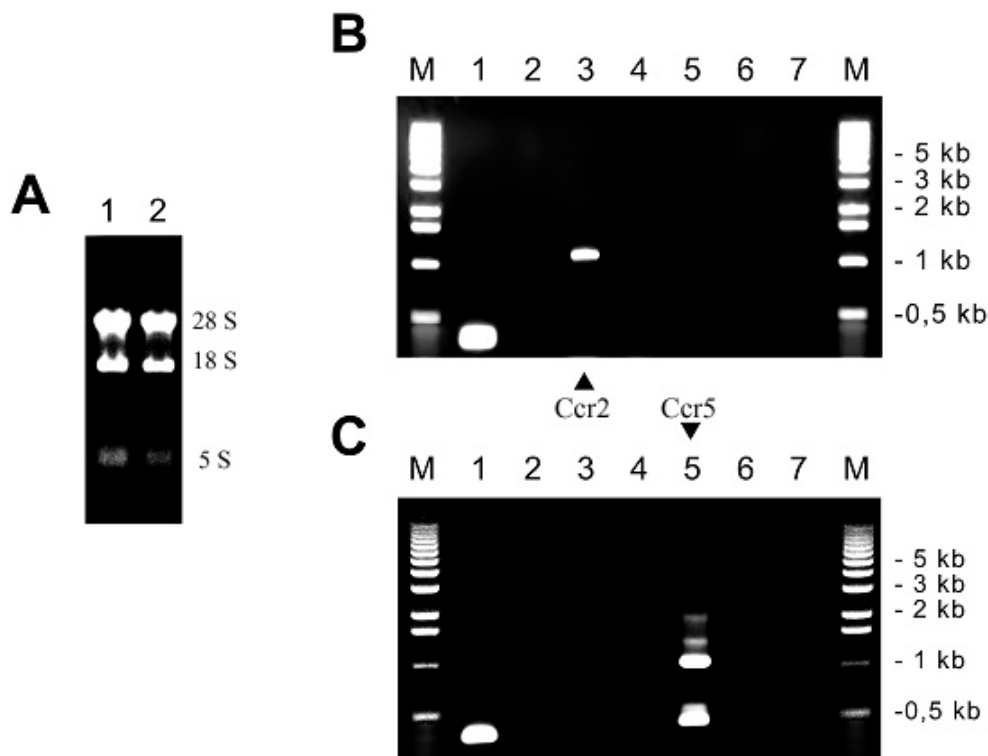
1	Wasserkontrolle	mit	Ccr2-Primern	(keine spezifische Bande)
2	Wasserkontrolle	mit	Ccr5-Primern	(keine spezifische Bande)
3	CHO- <i>mCCR5</i> -DNA	mit	Ccr2-Primern	(keine spezifische Bande)
4	CHO- <i>mCCR5</i> -DNA	mit	Ccr5-Primern	spezifische Bande von 1095bp (Ccr5)
5	CHO- <i>mCCR2</i> -DNA	mit	Ccr2-Primern	spezifische Bande von 1163bp (Ccr2)
6	CHO- <i>mCCR2</i> -DNA	mit	Ccr5-Primern	(keine spezifische Bande)
7	CHO/ <i>dhFr</i> <sup>-</sup> -DNA	mit	Ccr2-Primern	(keine spezifische Bande)
8	CHO/ <i>dhFr</i> <sup>-</sup> -DNA	mit	Ccr5-Primern	(keine spezifische Bande)
9	genom. Maus-DNA	mit	Ccr2-Primern	spezifische Bande von 1163bp (Ccr2)
10	genom. Maus-DNA	mit	Ccr5-Primern	spezifische Bande von 1095bp (Ccr5)

M 1kb Leiter

Die Positivkontrollen mit genomischer Maus-DNA zeigten die erwartete spezifische Bande für Ccr2 (Spur 9) und Ccr5 (Spur 10). Die Negativkontrollen mit Wasser (Spuren 1 und 2), mit DNA aus *CHO-mCCR5*-Zellen und Ccr2-Primern (Spur 3), mit DNA aus *CHO-mCCR2*-Zellen und Ccr5-Primern (Spur 6) sowie mit DNA aus nicht transfizierten *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen (Spuren 7 und 8) zeigten keine spezifischen Banden. Durch dieses Experiment konnte die Integration der Ccr2- und Ccr5-Expressionskonstrukte in das Genom der *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zelllinie eindeutig nachgewiesen werden.

### 3.3.2. Nachweis der Ccr2- und Ccr5-Expression auf mRNA-Ebene

Um die Transkription der integrierten Ccr2- bzw. Ccr5-Sequenzen zu überprüfen, wurde versucht Ccr2- bzw. Ccr5-mRNA nachzuweisen. Hierfür wurde zuerst Gesamt-RNA isoliert und die Qualität der RNA-Präparationen auf einem analytischen MOPS-Agarosegel kontrolliert. Abb. 3-14A zeigt die Gesamt-RNA (5S-, 18S- und 28S-RNA-Banden) von *CHO-mCCR2*- und *CHO-mCCR5*-Zellen ohne Zeichen einer DNA-Verunreinigung oder RNA-Degradation. Mit einer reversen Transkriptase und Oligo-dT-Primern wurde die isolierte zelluläre mRNA in cDNA umgeschrieben. Zur Kontrolle einer Kontamination (z.B. mit genomischer DNA) wurde jede Probe halbiert und nur zu einer Hälfte reverse Transkriptase gegeben (RT<sup>+</sup>-Probe). Die andere Hälfte ohne reverse Transkriptase wurde ansonsten genau gleich behandelt (RT<sup>-</sup>-Kontrolle). Die cDNAs wurden anschließend als Templates in PCR-Reaktionen mit Ccr2- bzw. Ccr5-spezifischen Primern eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Abb. 3-14B zeigt eine spezifische Bande der erwarteten Größe für Ccr2 (1163 bp, Spur 3). Abb. 3-14C zeigt eine Bande der erwarteten Größe für Ccr5 (1095 bp, Spur 5). Die Negativkontrollen mit cDNA von *CHO-mCCR2*-Zellen und Ccr5-Primern bzw. mit cDNA von *CHO-mCCR5*-Zellen und Ccr2-Primern, die RT<sup>-</sup>-Kontrollen sowie die Wasser-Reagenzienkontrollen zeigten wie erwartet keine Banden. Durch diese Experimente konnte die Transkription der Ccr2- bzw. Ccr5-Konstrukte in den stabil transfizierten *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zellen nachgewiesen werden.



**Abb. 3-14** Nachweis der murinen Ccr2- bzw. Ccr5-mRNA in den stabil transfizierten CHO-Zellen

**A:** Analytisches 1% MOPS-Minigel zur Qualitätskontrolle der isolierten Gesamt-RNA

- 1 CHO-mCCR2-Gesamt-RNA
- 2 CHO-mCCR5-Gesamt-RNA

Das Gel zeigt 5S-, 18S- und 28S-RNA-Banden ohne Zeichen einer DNA-Verunreinigung oder RNA-Degradation.

**B:** RT-PCR-Produkte von CHO-mCCR2-mRNA auf 0,6% Agarosegel aufgetrennt.

- |   |  |   |
|---|--|---|
| 1 | β-Aktin-Primer                                       | Positivkontrolle ( <i>housekeeper</i> -Gen) |
| 2 | -RT <sup>-</sup> -Kontrolle                          | (keine spezifische Bande)                   |
| 3 | Ccr2-Primer  | PCR-Produkt von 1162 bp (Ccr2)              |
| 4 | -RT <sup>-</sup> -Kontrolle                          | (keine spezifische Bande)                   |
| 5 | Ccr5-Primer  | (keine spezifische Bande)                   |
| 6 | -RT <sup>-</sup> -Kontrolle                          | (keine spezifische Bande)                   |
| 7 | H <sub>2</sub> O-Reagenzienkontrolle mit Ccr2-Primer | (keine spezifische Bande)                   |

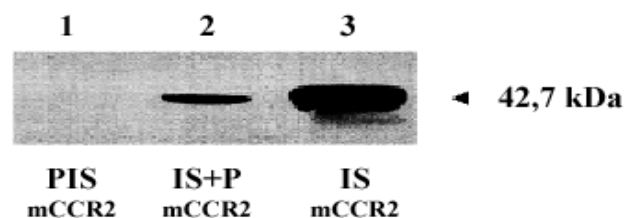
**C:** RT-PCR-Produkte von CHO-mCCR5-mRNA auf 0,6% Agarosegel aufgetrennt.

- |   |  |  |
|---|--|--|
| 1 | β-Aktin-Primer                                       | Positivkontrolle ( <i>housekeeper</i> -Gen)      |
| 2 | -RT <sup>-</sup> -Kontrolle                          | (keine spezifische Bande)                        |
| 3 | Ccr2-Primer  | (keine spezifische Bande)                        |
| 4 | -RT <sup>-</sup> -Kontrolle                          | (keine spezifische Bande)                        |
| 5 | Ccr5-Primer  | PCR-Produkt von 1094 bp (Ccr5)                   |
|   |  | und 3 weitere Banden (z.B. mRNA-Splice Produkte) |
| 6 | -RT <sup>-</sup> -Kontrolle                          | (keine spezifische Bande)                        |
| 7 | H <sub>2</sub> O-Reagenzienkontrolle mit Ccr5-Primer | (keine spezifische Bande)                        |

M 1kb-Leiter

### 3.3.3 Nachweis der Ccr2-Expression auf Proteinebene

Um eine Expression von Ccr2- und Ccr5-Protein in den transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden zunächst Western Blots mit Proteinextrakten aus den stabil transfizierten *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zelllinien durchgeführt. Die Proteingemische wurden hierfür elektrophoretisch auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Detektion der Ccr2- und Ccr5-Proteine wurden polyklonale Kaninchen-Immunsereen gegen die N-terminalen Peptide von Ccr2 bzw. Ccr5 eingesetzt. Abb. 3-15 zeigt eine spezifische Bande für Ccr2 von 42,7kDa. Das Signal nimmt bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Antiserum und dem *mCCR2*-Peptid (IS+P) ab und ist mit Präimmunsereum (PIS) nicht nachweisbar.



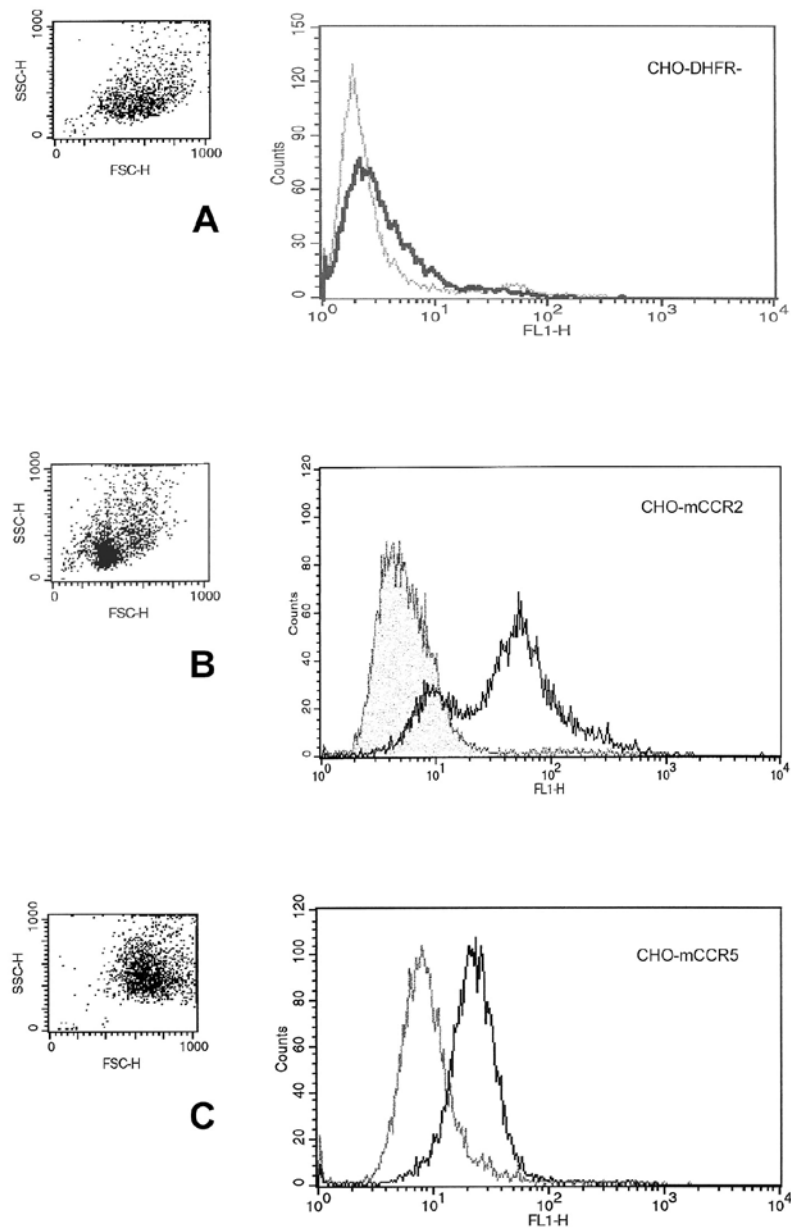
**Abb. 3-15 Western Blot zum Nachweis von Ccr2-Protein**

Proteinextrakt aus *CHO-mCCR2*-Zellen wurde in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Proteinfiler wurde mit Präimmunsereum (PIS; Spur 1), *mCCR2*-Immunsereum und *mCCR2*-Peptid (IS+P; Spur 2) sowie *mCCR2*-Immunsereum (IS; Spur 3) inkubiert. Mit Immunsereum zeigte sich eine spezifische Bande der erwarteten Größe von ca. 42,7kDa, die mit *mCCR2*-Peptid abnimmt und mit Präimmunsereum nicht erscheint.

Ein Nachweis von Ccr5-Protein im Western Blot gelang nicht eindeutig. Aufgrund der zwischenzeitlich vorliegenden Durchflusszytometrie-Ergebnisse, mit Nachweis von Ccr2- bzw. Ccr5-Protein auf der Zelloberfläche der transfizierten CHO-Zellen, wurde auf einen Nachweis des Ccr5-Proteins durch Western Blot verzichtet.

### 3.3.4 Nachweis von Ccr2- und Ccr5-Protein auf der Zelloberfläche

Um die Oberflächenexpression der transfizierten Chemokinrezeptoren zu kontrollieren, wurden die *CHO-mCCR2*- und *CHO-mCCR5*-Zellen in der Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit *Anti-mCCR2*- bzw. *Anti-mCCR5*-Immunsereum inkubiert. Anschließend wurden die an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper mit einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert. In der Durchflusszytometrie wurde dann die Höhe der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren über die Messung der Fluoreszenzintensität FL-1 im FITC-Kanal bestimmt.



### Abb. 3-16 Nachweis der Oberflächenexpression von Ccr2 und Ccr5 in der Durchflusszytometrie

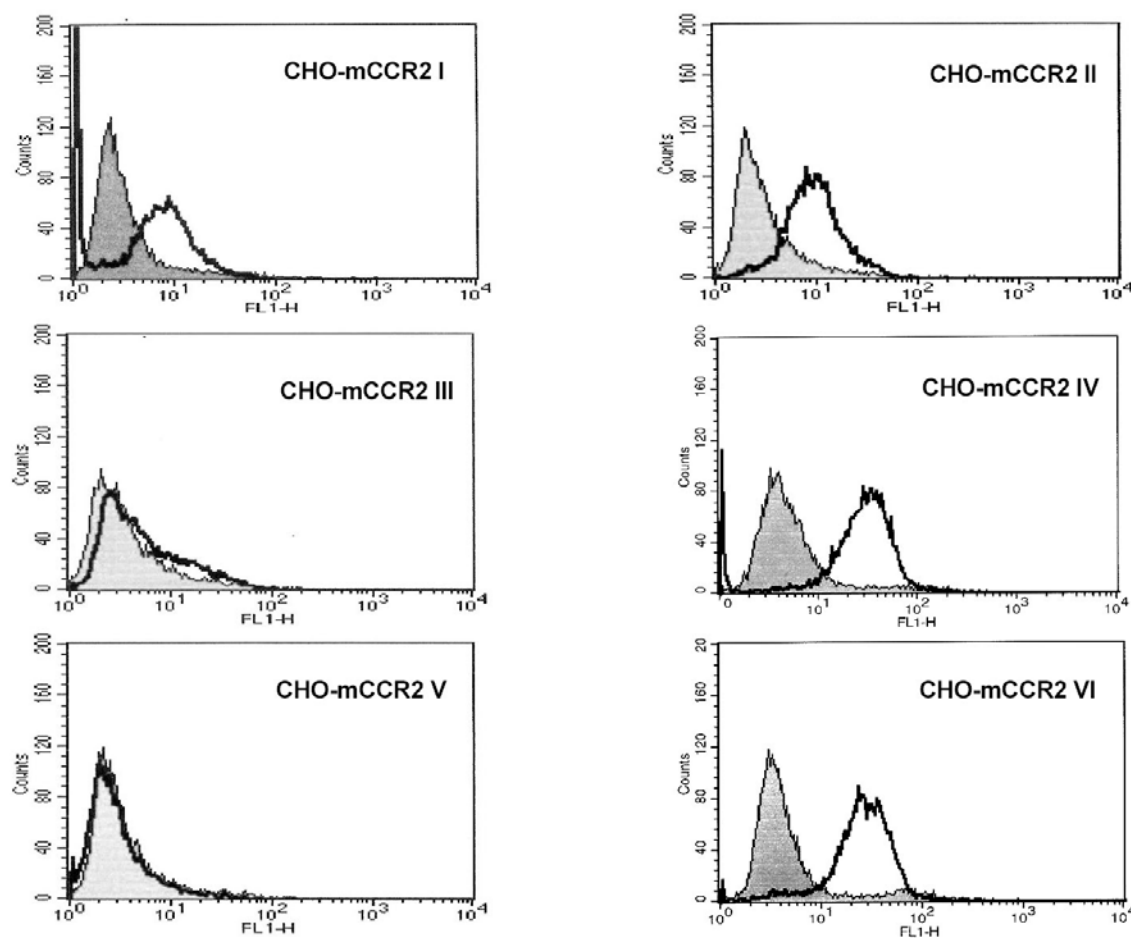
CHO-Zellsuspensionen wurden auf Eis erst mit Präimmenserum (grau), *Anti-mCCR2*- oder *Anti-mCCR5*-Immunsereum (schwarz) und anschließend mit FITC-markierten sekundärem Antikörper inkubiert und dann im Durchflusszytometer untersucht. Gezeigt sind Dotplots (forward und sideward scatter) und Histogramme (Fluoreszenzintensität FL-1) mit jeweils 10.000 Zellen pro Analyse.

- A: *CHO-dhFr*<sup>-</sup>-Zellen inkubiert mit PIS bzw. IS zeigten keine signifikante Änderung von FL-1 (Median 2,1→2,7).  
 B: Die *CHO-mCCR2*-Massenkultur zeigte zwei Populationen, von denen eine Ccr2 stark und eine Ccr2 schwach auf der Oberfläche exprimiert (FL-1 Median: 5→43).  
 C: *CHO-mCCR5* zeigte eine eindeutige, aber schwache Ccr5-Expression (FL-1 Median: 8→22).

*CHO-mCCR2*-Zellen zeigten in der Durchflusszytometrie eine zweigipflige Fluoreszenzverteilung, wobei der größere Teil der Zellen eine starke Oberflächenexpression

von Ccr2 zeigte, während eine zweite Population Ccr2 nur schwach exprimierte (Abb. 3-16B). *CHO-mCCR5*-Zellen zeigten eine schmale, eingipflige Fluoreszenzverteilung mit einer eindeutigen, aber relativ schwachen Oberflächenexpression von Ccr5 (Abb. 3-16C). Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen, die wie erwartet keine Änderung der relativen Fluoreszenzintensität FL-1 nach Inkubation mit Präimmunsrum (PIS) oder Immunsrum (IS) zeigten (Abb. 3-16A). Als Isotyp-Kontrollen zeigten *CHO-mCCR5*-Zellen keinen Unterschied zwischen PIS und *Anti-mCCR2-IS* sowie *CHO-mCCR2*-Zellen zwischen PIS und *Anti-mCCR5-IS* (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der heterogenen Expression von Ccr2 in der *CHO-mCCR2*-Massenkultur wurden Einzelzellklone durch serielle Verdünnung isoliert und expandiert. Von den ersten sechs untersuchten Ccr2-„Einzelzell-Kulturen“ waren vier in der Durchflusszytometrie positiv und zwei negativ (Abb. 3-17). *CHO-mCCR2-I* und *-II* zeigten eine geringe, *CHO-mCCR2-IV* und *-VI* eine starke und *CHO-mCCR2-III* und *-V* zeigten keine Expression von Ccr2 auf der Zelloberfläche.



**Abb. 3-17 Kontrolle der Oberflächenexpression von Ccr2 auf *CHO-mCCR2*-Einzelzellklonen I-VI**

Durchflusszytometrie mit FL-1-Histogramm von je 10.000 Zellen der *CHO-mCCR2*-Einzelzellklone I-VI.

*CHO-mCCR2 I* und *II* zeigten eine schwache Ccr2-Oberflächenexpression (FL-1 Median I: 2→10; II: 2→13).

*CHO-mCCR2 IV* und *VI* zeigten eine kräftige Ccr2-Oberflächenexpression (FL-1 Median IV: 3→42; VI: 3→35).

*CHO-mCCR2 III* und *V* zeigten keine relevante Ccr2-Oberflächenexpression.

Durch diese Experimente konnten zwei Zelllinien (*CHO-mCCR2-IV*, *CHO-mCCR5-1*) identifiziert werden, die eine deutliche Expression von Ccr2 bzw. Ccr5 auf der Zelloberfläche zeigten. Eine Kontrolle in der Durchflusszytometrie zeigte auch nach mehrfacher Passage eine stabile Expression der transfizierten Chemokinrezeptoren. Zur weiteren Verwendung wurden diese zwei Zellklone expandiert. Sie wurden für funktionelle Untersuchungen, Agonisten/Antagonisten-Studien und als Positivkontrollen für die Etablierung verschiedener Methoden wie Immunfluoreszenz, *in-situ* Hybridisierung und Chemotaxis-Assays eingesetzt.

### **3.4 STEIGERUNG DER EXPRESSION VON Ccr2 UND Ccr5 IN ÜBEREXPRIMIERENDEN ZELLINIEN DURCH GEN-AMPLIFIKATION**

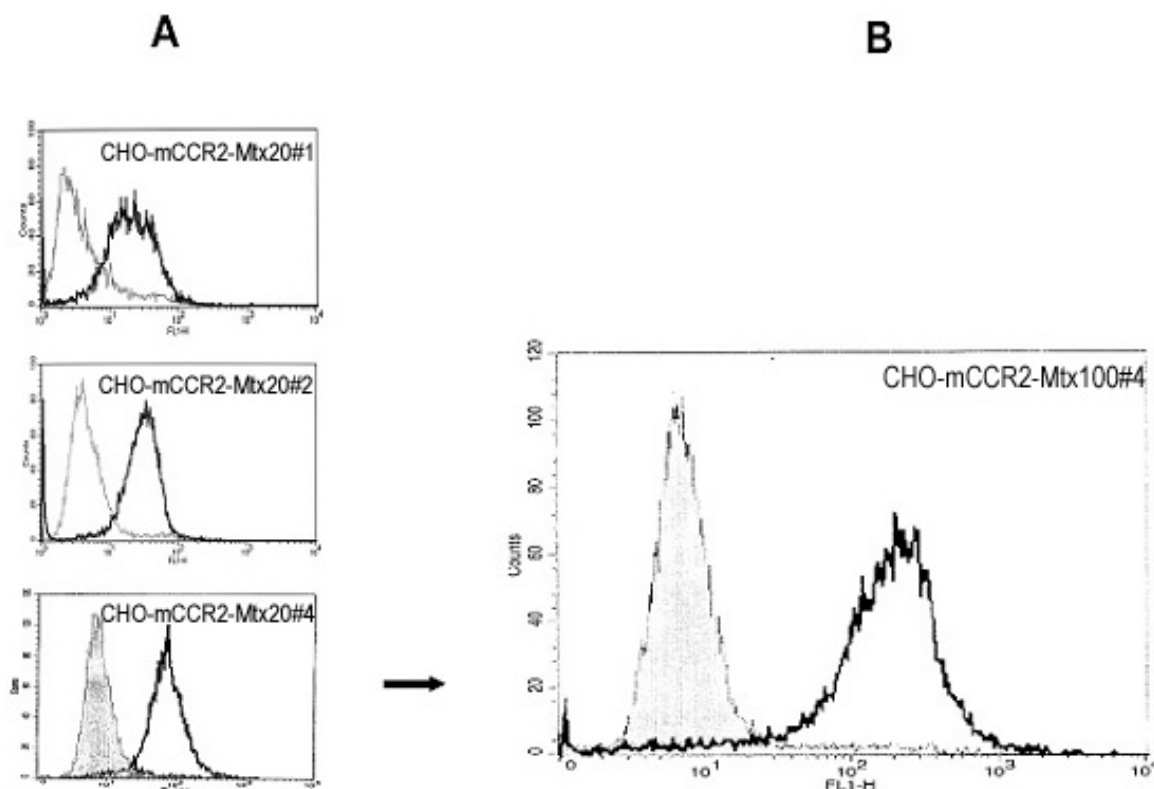
Für die geplante Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Ccr2 und Ccr5 sollte eine möglichst große Zahl der murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 bzw. Ccr5 auf der Zelloberfläche der transfizierten CHO-Zellen erreicht werden. Deshalb wurde versucht, die Expression von Ccr2 und Ccr5 durch Gen-Amplifikation weiter zu steigern. Mit dem Folsäure-Antagonisten Methotrexat wurde ein Selektionsdruck erzeugt, der zu einer Amplifikation und gesteigerten Expression des transfizierten DHFR-Gens führte (Kaufman und Sharp 1982). Aufgrund der gemeinsamen bicistronischen Transkriptionseinheit sollte dies zu einer gleichzeitigen Co-Amplifikation und Überexpression der Ccr2- bzw. Ccr5-Expressionskonstrukte führen.

In einem ersten Amplifikationsschritt wurden die beiden positiven Zellklone *CHO-mCCR2-IV* bzw. *CHO-mCCR5* in Selektionsmedium mit 20nM Methotrexat kultiviert. Viele Zellen überlebten den verstärkten Selektionsdruck unter Methotrexat nicht. Die Zellteilungsrate nahm deutlich ab, und es zeigten sich einige Riesenzellen mit auffällig veränderter Morphologie (Abb. 3-12C). Nach weiteren 10 Wochen hatten sich die Zellen dem Selektionsdruck durch 20nM Mtx angepasst, und sowohl Zellmorphologie als auch Wachstumsgeschwindigkeit hatten sich wieder nahezu normalisiert.

Die Abb. 3-18A und 3-19A zeigen die Durchflusszytometrie-Ergebnisse von je drei *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zellklonen mit unterschiedlich hoher Rezeptorexpression. *CHO-mCCR5-Mtx20#1* zeigte eine Steigerung der Ccr5-Oberflächenexpression (FL-1 Median: 9→55) mit eingipfliger, breitbasiger Verteilung. Der zweigipflige Kurvenverlauf für *CHO-mCCR5-Mtx20#2* zeigte eine Population mit höherem und eine mit niedrigerem Ccr5-Expressionsniveau. Bei *CHO-mCCR5-Mtx20#3* exprimierte nur noch eine kleine Population Ccr5, während die meisten Zellen nahezu keine Ccr5-Oberflächenexpression mehr zeigten.

Wir wählten die Zellklone *CHO-mCCR2-Mtx20#4* und *CHO-mCCR5-Mtx20#1* aufgrund der relativ hohen Chemokinrezeptor-Expression für die weitere Verwendung aus. In einem zweiten Gen-Amplifikationsschritt wurden die Zellen in 40nM Mtx kultiviert, ohne dass sich eine wesentliche Änderung der Zellteilungsrate oder Zellmorphologie einstellte. Erst bei

Steigerung der Mtx-Konzentration auf 100 nM kam es wieder zu einem sichtbaren Selektionsprozess. Nach ca. 10 Wochen Kultur in 100nM Mtx hatten sich Wachstumsgeschwindigkeit und Morphologie nahezu normalisiert. Aus diesen Mischpopulationen wurden wieder Einzelzellen isoliert und amplifiziert. Die Rezeptorexpression dieser Einzelzellklone wurde in der Durchflusszytometrie untersucht. Viele Zellklone zeigten eine deutliche Abnahme der Ccr2- bzw. Ccr5-Expression (Daten nicht gezeigt). Einige Zellklone zeigten aber die durch die Selektion und Gen-Amplifikation erhoffte gesteigerte Expression der transfizierten Chemokinrezeptoren.



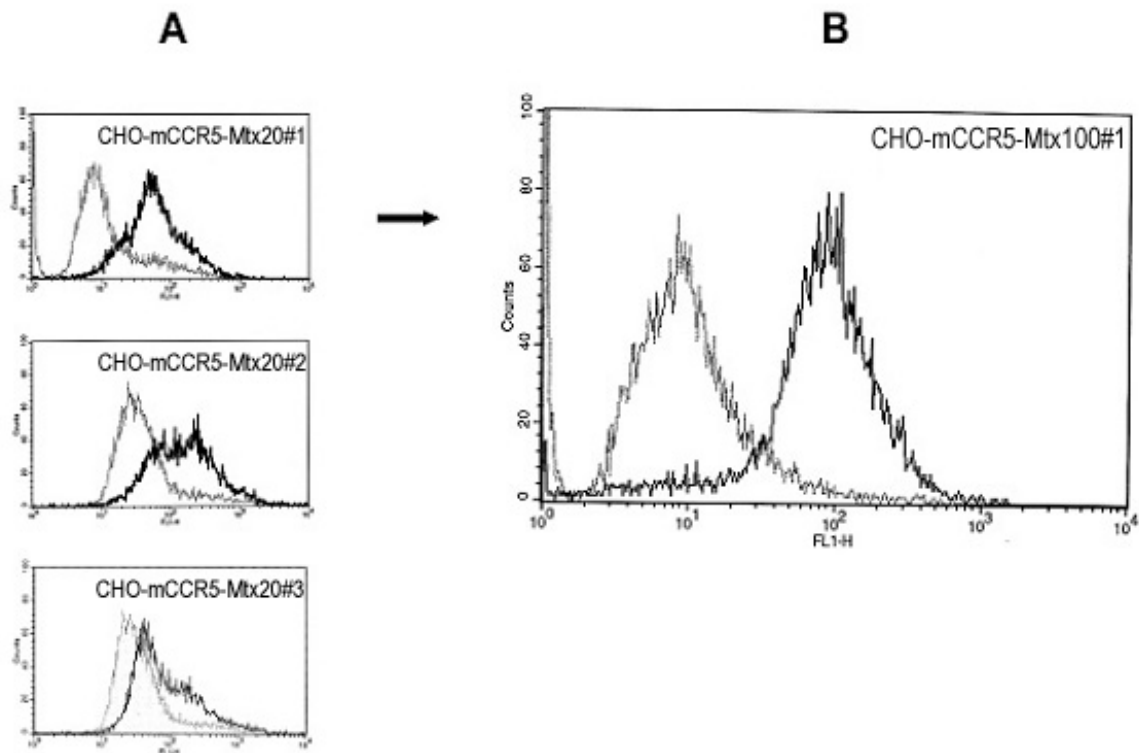
**Abb. 3-18 Oberflächenexpression von Ccr2 auf *CHO-mCCR2*-Zellklonen nach Gen-Amplifikation mit Mtx**

A: Nach ca. 10 Wochen Selektion mit 20nM Mtx fand sich bei den beispielhaft gezeigten Zellklonen *CHO-mCCR2-Mtx20#1*, #2 und #4 eine unterschiedlich hohe Ccr2-Oberflächenexpression (FL-1 Median #1: 3→19; #2: 4→29; #4: 7→69).

B: Nach Selektion mit 100nM Mtx konnte eine weitere deutliche Steigerung der Ccr2-Oberflächenexpression (FL-1 Median: 7→175) erreicht werden.

Die Zellklone *CHO-mCCR2-Mtx100#4* (Abb. 3-18B) und *CHO-mCCR5-Mtx100#1* (Abb. 3-19B) zeigten die höchste Expression von Ccr2 bzw. Ccr5 auf der Zelloberfläche. Diese Zellen wurden von M. Mack und J. Cihak für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Ccr2 und Ccr5 weiterverwendet (Mack et al. 2001).





**Abb. 3-19 Oberflächenexpression von Ccr5 auf *CHO-mCCR5*-Zellklonen nach Gen-Amplifikation mit Mtx**

A: Unter dem Selektionsdruck mit Mtx hatten sich Zellpopulationen mit unterschiedlichem Rezeptor-Expressionsniveau entwickelt. Gezeigt sind die Durchflusszytometrie-Ergebnisse der *CHO-mCCR5-Mtx20*-Zellklone #1, #2 und #3 nach ca. 10 Wochen Kultur in 20nM Mtx gezeigt. *CHO-mCCR5-Mtx20#1* zeigte eine Steigerung der Ccr5-Oberflächenexpression (FL-1 Median: 9→55) mit eingipfliger, breitbasiger Verteilung. *CHO-mCCR5-Mtx20#2* und #3 hatten eine zweigipflige Verteilung, wobei *CHO-mCCR5-Mtx20#2* eine Population mit hohem und eine mit niedrigem Ccr5-Expressionsniveau besaß; *CHO-mCCR5-Mtx20#3* zeigte nahezu keine Ccr5-Oberflächenexpression mehr.

B: Nach Selektion mit 100nM Mtx konnte eine weitere deutliche Steigerung der Ccr5-Oberflächenexpression (FL-1 Median: 8→84) erreicht werden.

### 3.5 NACHWEIS EINER FUNKTIONELLEN EXPRESSION DER MURINEN CHEMOKINREZEPTOREN Ccr2 UND Ccr5 IN STABIL TRANSFIZIERTEN CHO-ZELLEN

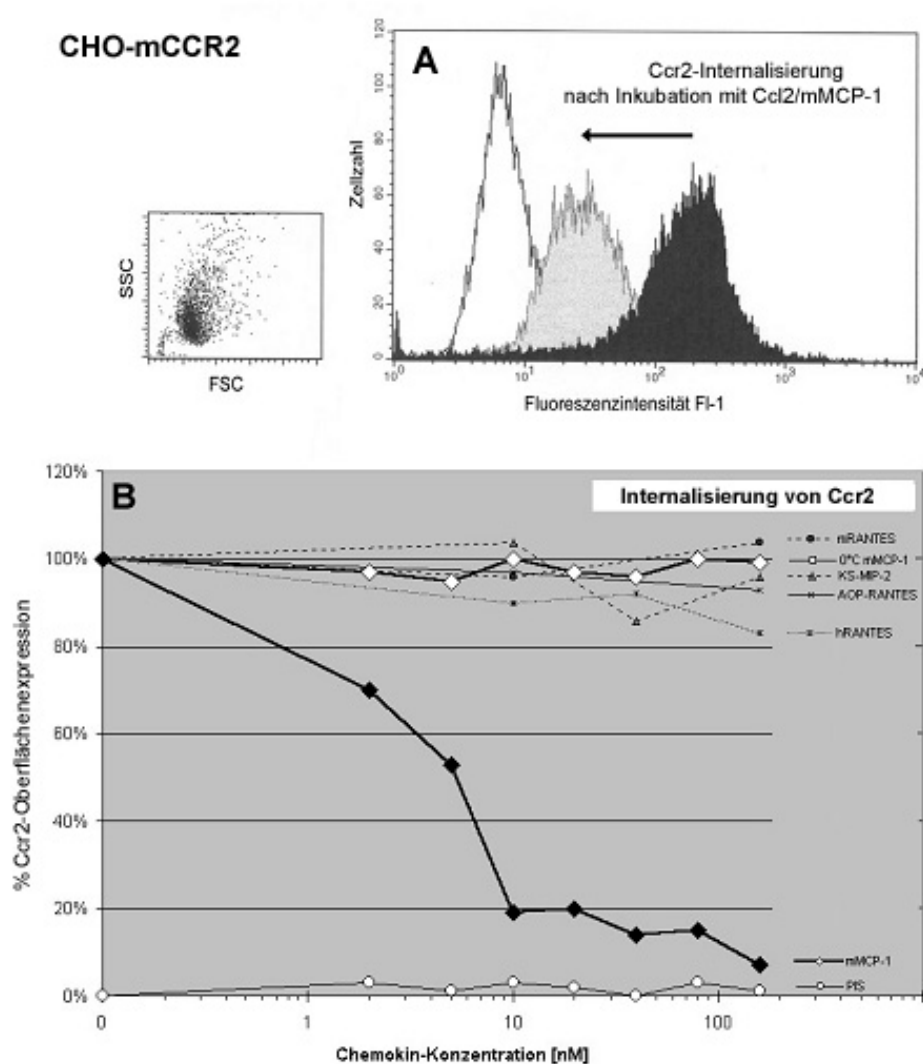
Um die Funktionalität der transfizierten Chemokinrezeptoren auf den *CHO-mCCR2*- und *CHO-mCCR5*-Zellen nachzuweisen, wurde die Liganden-induzierte Rezeptorinternalisierung und das anschließende Rezeptorrecycling im Durchflusszytometer untersucht. Für die Versuche wurden die Zellklone *CHO-mCCR2-IV*, *CHO-mCCR2Mtx20#4* und *CHO-mCCR2Mtx100#4* bzw. *CHO-mCCR5-I* und *CHO-mCCR5Mtx100* verwendet. Jedes Experiment wurde zur Kontrolle mehrfach durchgeführt. Trotz unterschiedlicher Höhe der Rezeptorexpression waren die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen identisch.

### 3.5.1 Rezeptorinternalisierung

Die Bindung zwischen Chemokin und Chemokinrezeptor führt zu einer Aktivierung von Rezeptor-assoziierten  $G_i$ -Proteinen mit Senkung des cAMP-Spiegels, Freisetzung von intrazellulärem Calcium und Phosphorylierung des Rezeptors. Hierdurch kommt es zu einer Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin und einer Endozytose des Rezeptor-Arrestin-Komplexes in *Clathrin-coated pits*. Diese Liganden-induzierte Endozytose lässt sich gut über die Änderung der Chemokinrezeptordichte auf der Zelloberfläche in der Durchflusszytometrie untersuchen. Da diese Rezeptorinternalisierung Ausdruck der funktionellen Bindung von Chemokin und Chemokinrezeptor ist, wurde sie als funktioneller Test für die transfizierten Chemokinrezeptoren verwendet. Um die Funktionalität und Spezifität der transfizierten Rezeptoren zu untersuchen, wurde die Veränderung ihrer Oberflächendichte nach Inkubation mit unterschiedlichen Chemokinen analysiert.

Internalisierung und Recycling der Chemokinrezeptoren sind temperaturabhängig. Sie nehmen bei Temperaturabnahme ab und sind bei unter  $6^\circ\text{C}$  vollständig inhibiert. Um eine Störung der Antikörper-Bindung nach Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktion als Grund für die Abnahme der Fluoreszenzintensität auszuschließen, wurden parallel identische Testreihen bei  $0^\circ\text{C}$  durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal war ohne Chemokin bei  $37^\circ\text{C}$  und  $0^\circ\text{C}$  gleich. Nach Inkubation mit Chemokin kam es bei  $37^\circ\text{C}$  zu einer Rezeptorinternalisierung mit entsprechender Abnahme des Fluoreszenzsignals, bei  $0^\circ\text{C}$  kam es dagegen zu keiner Änderung.

Ccr2 zeigte reproduzierbar eine konzentrationsabhängige Internalisierung nach Inkubation mit seinem physiologischen Liganden Ccl2/mMCP-1 (Abb. 3-20). Nach 45min Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  mit 2nM Ccl2/mMCP-1 zeigte sich eine Reduktion der Ccr2-Oberflächenexpression auf 70%, bei 5nM Ccl2/mMCP-1 schon auf 50% und bei 10nM Ccl2/mMCP-1 auf 20%. Eine weitere Steigerung der Ccl2/mMCP-1-Konzentration führte nur noch zu einer geringen zusätzlichen Reduktion der Oberflächenexpression. Bei 20nM Ccl2/mMCP-1 lag die Oberflächenexpression von Ccr2 weiterhin bei 20%, bei 40nM und 80nM war sie auf 15% und bei 160nM auf 10% gesunken. Als Negativkontrolle wurde die Oberflächendichte nach Inkubation *ohne* Ccl2/mMCP-1 bei  $37^\circ\text{C}$  für 45min sowie die gesamte Testreihe mit aufsteigenden Ccl2/mMCP-1-Konzentrationen jeweils parallel für 45min bei  $0^\circ\text{C}$  durchgeführt. Bei diesen Experimenten kam es wie erwartet zu keiner Änderung der Ccr2-Oberflächendichte. Ccr2 zeigte, wie erwartet, eine hohe Spezifität für Ccl2/mMCP-1. Eine Inkubation mit den Chemokinen Ccl5/mRANTES, CCL5/RANTES, AOP-RANTES und KS-MIP-II führten zu keiner wesentlichen Veränderung der Ccr2-Oberflächenexpression (Abb. 3-20).



**Abb. 3-20 Konzentrationsabhängige Internalisierung von Ccr2 auf CHO-mCCR2-Zellen**

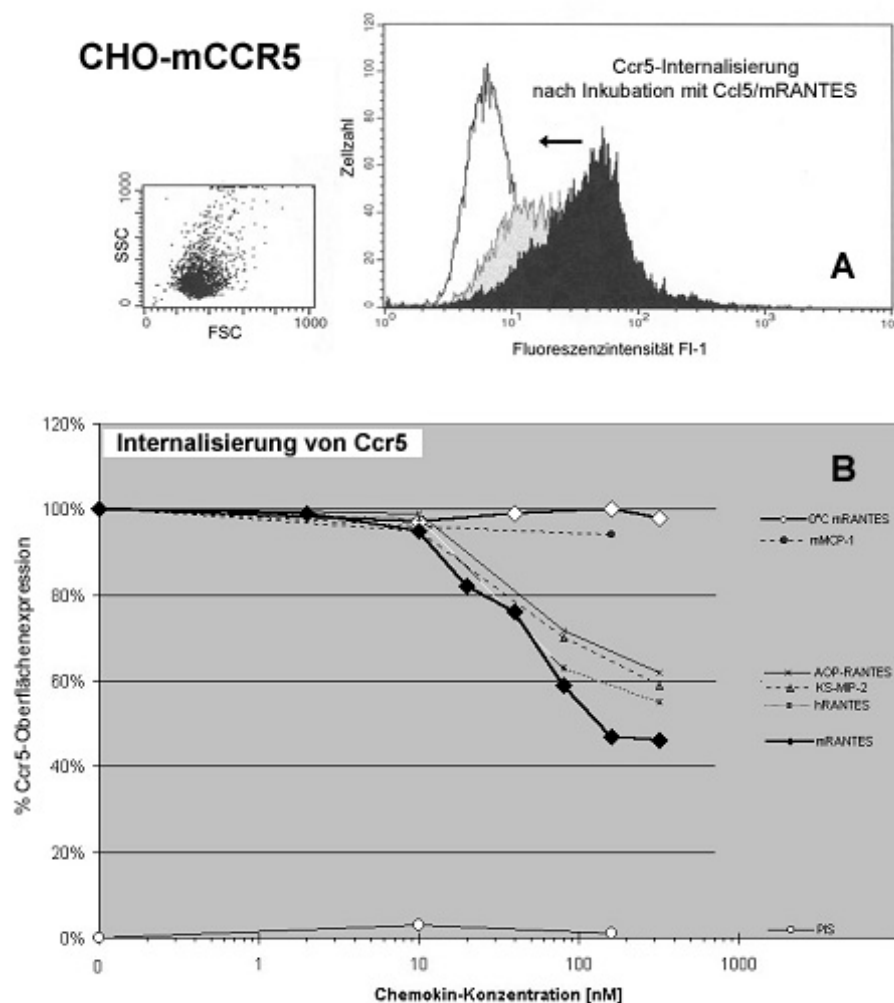
CHO-mCCR2-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Ccl2/mMCP-1 und anderen Chemokinen für 45min inkubiert, und die Ccr2-Internalisierung wurde anschließend im Durchflusszytometer untersucht.

**A:** Das Histogramm zeigt die Ccr2-Oberflächenexpression auf CHO-mCCR2-Zellen vor (schwarz) und nach (grau) Inkubation mit 10nM Ccl2/mMCP-1 (45min bei 37°C). Präimmuneserum (weiß).

**B:** Darstellung der Ccr2-Oberflächenexpression (in Prozent) zur logarithmisch aufgetragenen Ccl2/mMCP-1-Konzentration (schwarze Rauten). Es zeigt sich eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der Oberflächenexpression auf unter 20% des Ausgangswertes. Ccl5/mRANTES, CCL5/RANTES, AOP-RANTES und KS-vMIP-II hatten keinen Einfluss auf die Ccr2-Oberflächenexpression. Präimmuneserum (PIS): weiße Kreise. Negativkontrolle durch parallele Testreihe bei 0°C (weiße Rauten).

CHO-mCCR5-Zellen zeigten ebenfalls reproduzierbar eine konzentrationsabhängige Ccr5-Internalisierung nach Inkubation mit dem physiologischen Liganden Ccl5/mRANTES. Die Oberflächenexpression von Ccr5 war bei 2nM und 10nM Ccl5/mRANTES relativ unverändert. Bei 20nM Ccl5/mRANTES kam es zu einer Abnahme der Oberflächenexpression auf 80%, die schrittweise mit steigender Konzentration bis unter 50% bei 160nM

Ccl5/mRANTES sank. Eine weitere Erhöhung der Ccl5/mRANTES-Konzentration auf 320nM führte zu keiner weiteren signifikanten Zunahme der Internalisierung. Eine Inkubation mit CCL5/RANTES, AOP-RANTES und KS-vMIP-II führte ebenfalls zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität, während mit dem Ccr2-Liganden Ccl2/mMCP-1 keine signifikante Änderung zu beobachten war (Abb. 3-21). Die Negativkontrolle bei 0°C zeigte analog zu Ccr2 keine Änderung der Ccr5-Oberflächenexpression.



### Abb. 3-21 Konzentrationsabhängige Internalisierung von Ccr5 auf CHO-mCCR5-Zellen

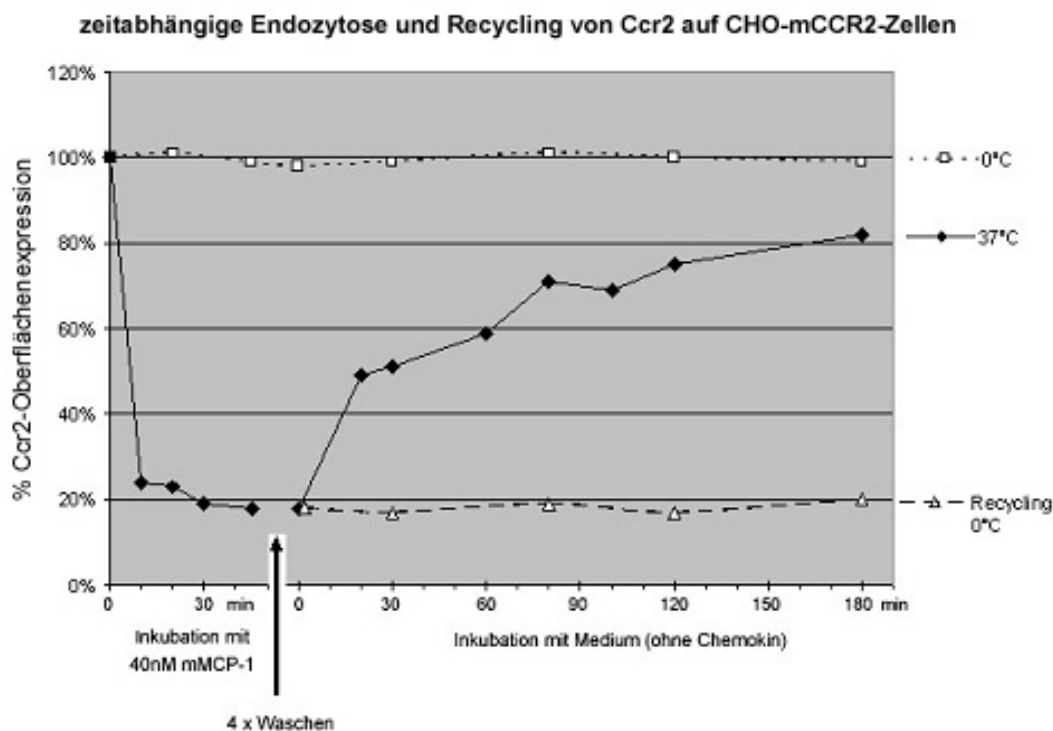
CHO-mCCR5-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Ccl5/mRANTES und anderen Chemokinen für 45min inkubiert, und die Ccr5-Oberflächenexpression wurde anschließend im Durchflusszytometer untersucht.

A: Das Histogramm zeigt die Ccr5-Internalisierung auf CHO-mCCR5-Zellen nach Inkubation mit 160nM Ccl5/mRANTES für 45min bei 37°C (grau). Präimmunsereum (weiß), Ccr5-Immunsereum vor Inkubation mit Ccl5/mRANTES (schwarz).

B: Darstellung der Ccr5-Oberflächenexpression (in Prozent) zur logarithmisch aufgetragenen Ccl5/mRANTES-Konzentration (schwarze Rauten). Es zeigt sich eine deutliche Rezeptorinternalisierung (bis 50%) unter aufsteigender Ccl5/mRANTES-Konzentration. CCL5/RANTES, AOP-RANTES und KS-MIP-II führten ebenfalls konzentrationsabhängig zu einer Ccr5-Internalisierung. Eine Inkubation mit dem Ccr2-Liganden Ccl2/mMCP-1 führte zu keiner wesentlichen Änderung der Ccr5-Oberflächenexpression. Präimmunsereum (PIS): weisse Kreise. Negativkontrolle durch parallele Testreihe mit Ccl5/mRANTES bei 0°C (weisse Rauten).

### 3.5.2 Rezeptorrecycling

Die Komplexe aus Chemokinrezeptoren und ihren Liganden werden nach der Internalisierung in *clathrin coated vesicles* zu den Endosomen transportiert. Dort werden die Rezeptoren dephosphoryliert, von dem Liganden gelöst und wieder an die Zelloberfläche *recycled* (Signoret et al. 2005). Um das Recycling der Chemokinrezeptoren an die Zelloberfläche zu untersuchen, wurden die stabil transfizierten CHO-Zellen nach Inkubation mit Chemokin gewaschen und in Medium ohne Chemokin weiter bei 37°C inkubiert. Das Recycling wurde beendet, indem die Zellen auf 0°C abgekühlt wurden. In der Durchflusszytometrie wurde FL-1, als Maß für die Höhe der Oberflächenexpression von Ccr2 bzw. Ccr5, zu den Zeitpunkten 20min, 30min, 60min, 80min, 100min, 120min und 180min gemessen. Die Oberflächenexpression sowie die Internalisierung und das Recycling der Chemokinrezeptoren wurden anhand der relativen Fluoreszenzintensität berechnet und die entsprechenden Werte sind in den Abb. 3-22 und 3-23 graphisch dargestellt.



**Abb. 3-22 Zeitverlauf der Internalisierung und des Recyclings von Ccr2 auf CHO-mCCR2-Zellen**

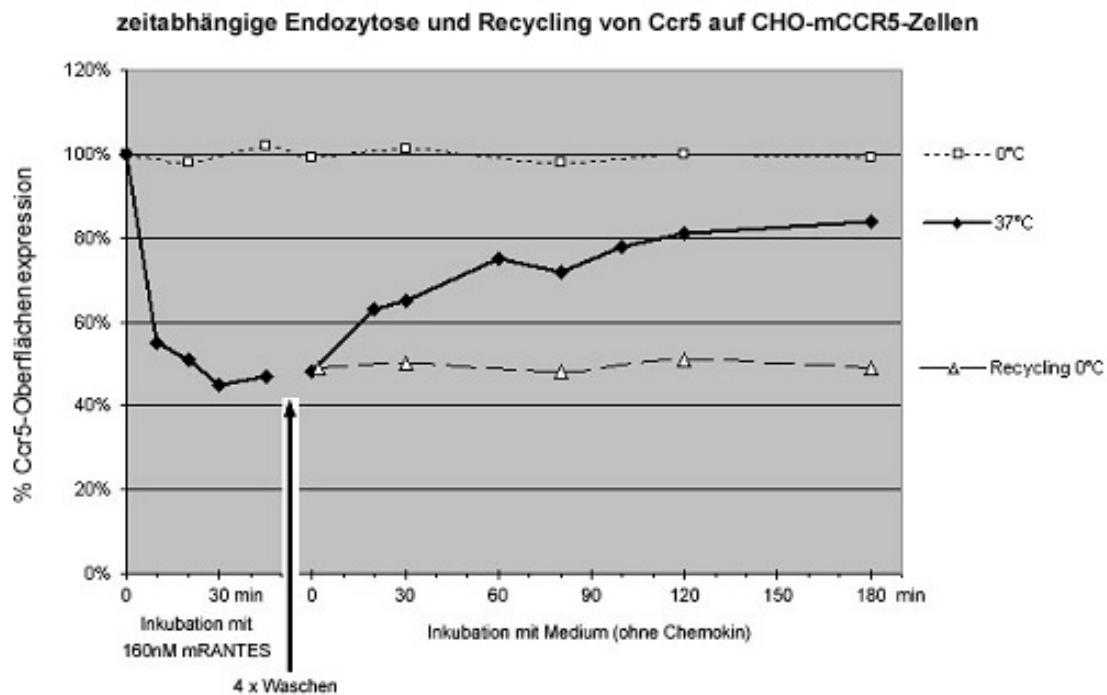
Darstellung der zeitabhängigen Endozytose und des Recyclings anhand der Durchflusszytometrie-Daten zur Ccr2-Oberflächenexpression (schwarze Rauten):

Endozytose: Nach 10min Inkubation mit 40nM Ccl2/mMCP-1 zeigte sich eine starke Internalisierung von Ccr2 mit Abnahme der Ccr2-Oberflächenexpression auf ca. 20%.

Waschen: Entfernen von Ccl2/mMCP-1 durch 4-maliges Waschen mit Medium; Zeitpunkt 0.

Recycling: Zeitabhängige Zunahme der Ccr2-Oberflächenexpression auf ca. 50% innerhalb der ersten 20min und auf ca. 80% nach 3h.

Die Kontrollen mit parallelen Testansätzen auf Eis zeigten keine Änderung der Fluoreszenzintensität (weiße Dreiecke und Quadrate).



**Abb. 3-23 Zeitverlauf der Internalisierung und des Recyclings von Ccr5 auf CHO-mCCR5-Zellen**

Darstellung der zeitabhängigen Endozytose und des Recyclings anhand der Durchflusszytometrie-Daten zur Ccr5-Oberflächenexpression (schwarze Rauten):

Endozytose: Nach 10min Inkubation mit 160nM Ccl5/mRANTES zeigte sich eine Ccr5-Internalisierung mit Abnahme der Ccr5-Oberflächenexpression auf ca. 50%.

Waschen: Entfernen von Ccl5/mRANTES durch 4-maliges Waschen mit Medium; Zeitpunkt 0.

Recycling: Zeitabhängige Zunahme der Ccr5-Oberflächenexpression auf ca. 60% innerhalb der ersten 20min, auf ca. 75% nach 1h und auf ca. 80% nach 3h.

Die Kontrollen mit parallelen Testansätzen auf Eis zeigten keine Änderung der Fluoreszenzintensität (weiße Dreiecke und Quadrate).

Für die Untersuchung des zeitabhängigen Rezeptorrecyclings wurden 40nM Ccl2/mMCP-1 und 160nM Ccl5/mRANTES eingesetzt. Bei diesen Konzentrationen wurde schon nach 10min eine nahezu maximale Rezeptorinternalisierung erreicht. Die Ccr2-Oberflächenexpression war nach 10min Inkubation mit 40nM Ccl2/mMCP-1 auf ca. 20% abgesunken. Die Ccr5-Oberflächenexpression hatte nach 10min Inkubation mit 160nM Ccl5/mRANTES auf ca. 50% abgenommen. Es zeigte sich auch nach 20min, 30min oder 45min Inkubation keine weitere signifikante Abnahme. Nach dem Auswaschen der Chemokine kam es zu einer erneuten zeitabhängigen Zunahme der Oberflächenexpression (Rezeptorrecycling). Die Oberflächen-expression erreichte nach 2-3h ca. 80-90% des Ausgangswertes.

Um eine *de novo* Synthese der Chemokinrezeptoren als Ursache für die erneute Zunahme der Oberflächenexpression auszuschließen, wurde das Recycling auch unter Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid untersucht (Daten nicht gezeigt). Hierunter kam es zu

identischen Ergebnissen. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich um ein echtes Recycling und keine *de novo* Rezeptorsynthese handelte. Dies wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (Mueller et al. 2002a).

In der vorliegenden Arbeit wurden CHO-Zelllinien generiert und charakterisiert, die entweder den murinen Chemokinrezeptor Ccr2 oder Ccr5 auf ihrer Zelloberfläche stark überexprimieren. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen die molekulare Klonierung, stabile Transfektion, Expression und anschließende Gen-Amplifikation von Ccr2 und Ccr5 sowie die funktionelle Charakterisierung der hergestellten Zelllinien. Diese Zelllinien und die hier dargestellten Protokolle erlauben eine einfache Untersuchung von Agonisten und Antagonisten von Ccr2 und Ccr5. Zudem dienen die Zellen als Positivkontrolle bei einer Vielzahl weiterer Untersuchungen von Ccr2 und Ccr5. Vor allem ist es aber unter Verwendung der überexprimierenden Zellklone *CHO-mCCR2-Mtx100#4* und *CHO-mCCR5-Mtx100#1* in einer Folgearbeit erstmals gelungen monoklonale Antikörper gegen Ccr2 und Ccr5 zu generieren (Mack et al. 2001). Diese Antikörper wurden seither von vielen Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt im Rahmen ihrer Experimente zu Ccr2 und Ccr5 erfolgreich eingesetzt und haben einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Rolle von Ccr2 und Ccr5 geleistet.

## 4 Diskussion

Die Arbeitsgruppe Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik beschäftigt sich seit über 10 Jahren mit der Erforschung der beiden nah verwandten Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5. Beide sind wesentlich an der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen im Rahmen der zellulären Immunantwort und an chronischen Entzündungsreaktionen beteiligt. Ein Teilprojekt war die in dieser Arbeit vorgestellte Herstellung und Charakterisierung von Ccr2- und Ccr5-exprimierenden Zelllinien.

### 4.1 PROBLEMSTELLUNG UND EXPERIMENTELLER ANSATZ

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren lediglich die cDNA-Sequenzen der murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 veröffentlicht. Es gab nur wenige, vorläufige Daten zur Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene, aber keine Daten zu Verteilung und Funktion der Rezeptorproteine auf Mauszellen. Ziel der Arbeit war es, Zelllinien herzustellen, die Ccr2 bzw. Ccr5 auf ihrer Oberfläche überexprimieren. Hierfür wurden die kodierenden Sequenzen für Ccr2 und Ccr5 aus genomischer Maus-DNA kloniert. Mit diesen Sequenzen wurden Expressionskonstrukte für Ccr2 und Ccr5 hergestellt und stabil in CHO-Zellen transfiziert. Diese erfolgreich transfizierten *CHO-mCCR2*- und *CHO-mCCR5*-Zelllinien dienten als Positivkontrolle zur Etablierung weiterer Untersuchungsmethoden für die beiden Rezeptoren wie z.B. Western Blot, Durchflusszytometrie- und FACS-Analysen, *in situ* Hybridisierung und Fluoreszenzmikroskopie. Vor allem aber ermöglichten sie erstmals die Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Ccr2 und Ccr5, die in einer Vielzahl von Folgearbeiten weiterverwendet wurden.

#### 4.1.1 Klonierungsstrategie und Sequenzanalyse

Das Ziel der Arbeit war die Herstellung von stabilen Zelllinien, die Ccr2 bzw. Ccr5 auf ihrer Oberfläche stark überexprimieren. Da diese Zellen zur Charakterisierung von Antisera, Agonisten und Antagonisten sowie zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern weiterverwendet werden sollten, war es wichtig, Mutationen in den klonierten Sequenzen auszuschließen. Die gesamte kodierende Sequenz von Ccr2 und Ccr5 liegt jeweils auf einem Exon, so dass eine einfache PCR-Klonierungsstrategie angewendet werden konnte. Hierfür wurden flankierende Primer mit einer optimalen *Kozak*-Sequenz im Bereich des Startcodons sowie speziellen Restriktionsschnittstellen (*XbaI* und *SalI*) für die weitere Klonierung designt. Für den Erfolg der Klonierungsstrategie war die Auswahl der passenden Restriktionsenzyme von großer Bedeutung. Es wurden jeweils singuläre Restriktionsschnittstellen für den Einbau in den Klonierungsvektor (*SrfI*), für die gerichtete Umklonierung in den Expressionsvektor



(*XbaI* und *SalI*) und für die Linearisierung des Expressionsvektors (*NdeI*) ausgesucht. Zusätzliche Schnittstellen für diese Restriktionsenzyme im Bereich der kodierenden Sequenzen, des Plasmids oder des Expressionsvektors wurden ausgeschlossen. Zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen aus genomischer Maus-DNA wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase, die aufgrund einer *proofreading*-5'-Exonuklease-Aktivität eine besonders niedrige Fehlerrate besitzt, verwendet. Die kodierenden Sequenzen wurden in die singuläre *SrfI*-Schnittstelle des Klonierungsvektors *pCR-Script* ligiert und das resultierende Plasmid in *E. coli* transformiert. Die Sequenzanalyse der Ccr2- bzw. Ccr5-Klone ergab einige Nukleinsäure- und Aminosäure-Austausche im Vergleich zu den veröffentlichten Ccr2- bzw. Ccr5-Sequenzen.

Die klonierte Ccr2-Sequenz aus Maus-Mesangialzell-DNA zeigte im Vergleich mit der von L. Boring erstveröffentlichten Ccr2-Sequenz (*GenBank* U47035) eine Punktmutation, die zu einem Austausch von Valin zu Isoleucin (232<sub>Val↔Ile</sub>) führte. Da Val und Ile zwei ähnliche, hydrophobe Aminosäuren sind und die Mutation in der 5. Transmembran-Domäne von Ccr2 lag, war ein Einfluss auf Ligandenbindung oder G-Proteinkopplung unwahrscheinlich. An der entsprechenden Position findet man in der sonst hochkonservierten 5. Transmembrandomäne bei einer Reihe von Chemokinrezeptoren unterschiedliche Aminosäuren. So findet man z.B. bei CCR1 und Ccr1 hier ein Isoleucin, bei CCR2 und CCR5 ein Valin, bei CCR3 ein Alanin und bei CCR4 und Ccr4 ein Leucin (Meyer et al. 1996). In Zusammenschau dieser Befunde wurde die Sequenz *mCCR2#5a* als natürliche Ccr2-Variante interpretiert und für die Herstellung von *CHO-mCCR2*-Zellen weiterbenutzt. Die N-terminale Aminosäuresequenz entsprach dem *mCCR2-Peptid* (MEDNNMLPQFIHC), welches für die Herstellung von polyklonalem *Anti-mCCR2-Immunserum* verwendet worden war.

Die Klonierung von Ccr5 gestaltete sich komplizierter. Für die initial klonierte Ccr5-Sequenz *mCCR5-1* aus genomischer Maus-Mesangialzell-DNA, fanden sich 11 Aminosäure-Abweichungen zu der erstveröffentlichten Ccr5-Sequenz von L. Boring (*GenBank* U47036). Zudem lagen zwei N-terminale Mutationen (3<sub>Leu↔Phe</sub>, 11<sub>Ile↔Ser</sub>) im Bereich des *mCCR5-Peptides* (MDFEQGSVPTYSYDIDC), das für die Herstellung von polyklonalem *Anti-mCCR5-Immunserum* verwendet worden war. Hier war vor allem die Mutation 11<sub>Ile↔Ser</sub> mit Wechsel des hydrophilen Serin zum hydrophoben Isoleucin problematisch. Aus diesem Grund wurde Ccr5 deshalb erneut, diesmal aus genomischer *CD1*-Maus-DNA kloniert. Diese zweite klonierte Ccr5-Sequenz *mCCR5#4a* unterschied sich nur noch in 2 Aminosäuren (3<sub>Leu↔Phe</sub>, 208<sub>Pro↔Ser</sub>) von der Ccr5-Referenz-Sequenz von L. Boring. Ein Vergleich der beiden Sequenzen *mCCR5-1* und *mCCR5#4a* mit den veröffentlichten Ccr5-Sequenzen von Boring (*GenBank* U47036), Kuziel (U68565), Meyer (X94151), Kuhmann (U83327 und AF022990), Doranz (AF019772) und Kuno (D83648) ergab an insgesamt 13 Positionen wiederkehrende Punktmutationen mit Aminosäureaustauschen (3<sub>Leu↔Phe</sub>, 11<sub>Ser↔Ile</sub>, 62<sub>Lys↔Arg</sub>, 66<sub>Val↔Met</sub>, 97<sub>Val↔Ile</sub>, 109<sub>Leu↔Val</sub>, 156<sub>Ala↔Val</sub>, 160<sub>Phe↔Ser</sub>, 185<sub>Pro↔Leu</sub>, 208<sub>Pro↔Ser</sub>, 213<sub>Val↔Ile</sub>, 318<sub>Met↔Ile</sub>, 337<sub>Ala↔Val</sub>). Ein Einfluss dieser Polymorphismen auf die Funktion von Ccr5 ist bisher nicht weiter untersucht

worden. Für das humane CCR5-Gen sind auch eine Reihe von *single nucleotide polymorphisms* (wie z.B. 12<sub>Ile↔Leu</sub>, 20<sub>Cys↔Ser</sub>, 29<sub>Ala↔Ser</sub>, 42<sub>Ile↔Phe</sub>, 55<sub>Leu↔Gln</sub>, 60<sub>Arg↔Ser</sub>, 75<sub>Ala↔Val</sub>, 101<sub>Cys↔X</sub>, 178<sub>Cys↔Arg</sub>, 215<sub>Ser↔Leu</sub>, 223<sub>Arg↔Gln</sub>, 301<sub>Gly↔Val</sub>, 335<sub>Ala↔Val</sub>, 339<sub>Tyr↔Phe</sub>) beschrieben worden. Nur wenige dieser Mutationen haben tatsächlich einen Einfluss auf die Funktion von CCR5 (Quillent et al. 1998; Blanpain et al. 2000). So führt die CCR5-A29S-Mutation zu einer veränderten Liganden-Affinität. Einige Mutationen verhindern die normale Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche. So zerstören die CCR5-C20S- und CCR5-C178R-Mutationen die interne Disulfidbindung der Cystein-Reste C20/C269 bzw. C101/178. Die CCR5-C101X-Mutation führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon mit Kettenabbruch. Eine Untersuchung von CCR5-Varianten von *African Green Monkeys* zeigte einen Einfluss der häufigen *single nucleotide polymorphisms* auf den Verlauf einer Infektion mit SIV (*simian immunodeficiency virus*) (Kuhmann et al. 1997; Kuhmann et al. 2001).

Keine der untersuchten murinen Ccr5-Sequenzen zeigte Mutationen im Bereich der für die Tertiärstruktur wichtigen Cysteinreste C22/C271 und C103/C180. Es führte auch keine der Mutationen zu einem vorzeitigen Stoppcodon. Die Sequenzen *mCCR5-I* und *mCCR5#4* unterschieden sich in neun Aminosäuren voneinander, aber nur in je einer Aminosäure (3<sub>Leu↔Phe</sub>) von veröffentlichten Ccr5-Sequenzen. Die Sequenz *mCCR5#4* wurde weiter für die Herstellung von *CHO-mCCR5*-Zellen verwendet.

#### 4.1.2 Expression in eukaryontischen Zellen

Die meisten eukaryontischen Proteine, insbesondere auch membranständige Rezeptoren wie die Chemokinrezeptoren, benötigen für ihre volle biologische Aktivität spezifische posttranslationale Modifikation. Diese Veränderungen können in Bakterienzellen nicht durchgeführt werden, so dass für eine funktionelle Expression eukaryontische Wirtszellen benutzt werden müssen. Einige Arbeitsgruppen hatten Chemokinrezeptoren in *Xenopus Oozyten* durch eine cRNA-Mikroinjektion exprimiert (Murphy und Tiffany 1991; Charo et al. 1994; Boring et al. 1996). Diese Methode eignet sich aber nur für eine transiente Transfektion einer sehr begrenzten Anzahl von Zellen und war daher für unsere Zielsetzung ungeeignet. Die zwei am häufigsten eingesetzten eukaryontischen Zellen für die stabile Transfektion und Charakterisierung von Chemokinrezeptoren sind HEK-293 (*human embryonic kidney*)-Zellen (Yamagami et al. 1994; Proudfoot et al. 1995; Combadiere et al. 1998; Zaballo et al. 1999) und CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen (Samson et al. 1996a; Nibbs et al. 1997; Mack et al. 1998). Für die funktionelle Expression von Ccr2 und Ccr5 wurden *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen (ATCC, CRL-9096; Urlaub und Chasin 1980) ausgewählt. Sie erlaubten die Anwendung eines etablierten Gen-Amplifikationsverfahrens (Kaufman 1990), um eine möglichst hohe Rezeptorexpression zu erreichen. Das Prinzip beruht auf einer progressiven Selektion von Zellen, die durch Amplifikation eines transfizierten DHFR-Gens eine Resistenz gegen steigende Mtx-Konzentrationen entwickeln. Durch die Verwendung einer gemeinsamen,

bicistronischen Transkriptionseinheit für DHFR und das Zielgen (Ccr2 bzw. Ccr5) in den Expressionskonstrukten *pEF-mCCR2* bzw. *pEF-mCCR5* konnte eine effiziente Co-Amplifikation von Ccr2 bzw. Ccr5 in CHO-Zellen erreicht werden. Die Überexpression eines rekombinanten Proteins kann toxisch auf die Zelle wirken und zu dem Verlust des Zielgens oder zu einer Störung der funktionellen Rezeptorinternalisierung führen (Faussner et al. 2003). Deshalb wurde nach jedem Selektionsschritt die Oberflächenexpression und Internalisierung von Ccr2 und Ccr5 per Durchflusszytometrie kontrolliert. Bei mehreren Zellklonen war es unter der Selektion zu einem Verlust oder einer Abnahme der Chemokinrezeptorexpression gekommen. Bei einigen fand sich aber die erhoffte, deutliche Steigerung der Expression von Ccr2 bzw. Ccr5 auf der Zelloberfläche.

#### 4.1.3 Nachweismethoden

Durch die Sequenzierung der Inserts in den Plasmiden *pCR-mCCR2* und *pCR-mCCR5* konnten nachgewiesen werden, dass die gesamten kodierenden Sequenzen von Ccr2 und Ccr5 kloniert worden waren. Durch PCR konnte gezeigt werden, dass die transfizierten Ccr2- bzw. Ccr5-Sequenzen auch stabil in das Genom der *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zellen integriert worden waren. Durch RT-PCR konnten spezifische Transkripte für Ccr2- und Ccr5 in den transfizierten *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe des *Anti-mCCR2-Immunsersums* konnte denaturiertes Ccr2-Protein im Western Blot nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnte das Ccr5-Protein im Western Blot aufgrund unspezifischer Bindungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zunächst konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Mutation (3<sub>Leu</sub>→Phe) im Bereich des für die Herstellung des Antiserums verwendeten *mCCR5-Peptides* ein Problem darstellte. Alternativ wurden mögliche methodische Fehler wie z.B. eine Aggregation von Rezeptorproteinen im Rahmen des Aufkochens, eine unzureichende Blockade unspezifischer Bindungsstellen oder eine zu hohe Konzentration primärer Antikörper diskutiert. Als sich das Ccr5-Rezeptorprotein aber gut in der Durchflusszytometrie nachweisen ließ, wurde auf eine Optimierung des Western Blots verzichtet. Durch die Verwendung vitaler CHO-Zellen wurden nur die an der Zelloberfläche gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper in der Durchflusszytometrie untersucht. Auf diese Weise konnten Ccr2 und Ccr5 sicher auf der Oberfläche von stabil transfizierten CHO-Zellen nachgewiesen und die am höchsten exprimierenden Klone identifiziert werden. Als alternative Methode wurde die Herstellung von Rezeptoren mit einer N-terminalen Modifikation diskutiert (z.B. Insertion einer Influenza-Hämagglutinin-Sequenz), für die kommerzielle monoklonale Antikörper verfügbar gewesen wären. Problematisch wäre hierbei die Möglichkeit einer Änderung der Konformation und der Ligandenspezifität für funktionelle Untersuchungen gewesen. Zudem wären diese modifizierten Rezeptoren für die Herstellung monoklonaler Antikörper weniger geeignet gewesen.

#### 4.1.4 Funktionelle Untersuchung von Chemokinrezeptoren

Die Bindung eines Chemokins an den passenden Chemokinrezeptor löst eine Reihe von messbaren biologischen Antworten aus, die zur Untersuchung der Rezeptorfunktionalität dienen können. Es wurden sowohl Messungen zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium, extrazelluläre pH-Wert-Messungen mit einem Mikrophysiometer als auch Migrations-Assays mit den transfizierten Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der technische Aufwand war hierfür aber recht hoch, und die Methoden waren relativ stör anfällig, so dass sie sich nicht als Screeningtests für unsere Fragestellung eigneten. Als einfacher, reproduzierbarer und sehr aussagekräftiger funktioneller Test hat sich die Rezeptorinternalisierung von Chemokinrezeptoren erwiesen (Mack und Schlöndorff 2000).

Nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten der intrazellulären, C-terminalen Rezeptordomäne durch G-protein gekoppelte Kinasen (Aragay et al. 1998; Vila-Coro et al. 1999). Die phosphorylierten Rezeptoren binden über  $\beta$ -Arrestine an Clathrin und AP2 (*adaptor protein complex 2*). Dies führt zur Endozytose des Chemokin-Chemokinrezeptor-Komplexes in *clathrin coated vesicles*. Diese Rezeptorinternalisierung führte zu einer messbaren Abnahme der Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche, die schon nach wenigen Minuten einsetzte und ihr Maximum nach ca. 10-20min erreichte. Abb. 4-1 zeigt diese Internalisierung beispielhaft für CCR1 und CCL5/RANTES in der konfokalen Mikroskopie.



**Abb. 4-1 Internalisierung von fluoreszenzmarkierten Chemokinen** (aus Solari 1997)

Konfokale Mikroskopie von CHO-CCR1-Zellen und Internalisierung des Chemokinrezeptor-Liganden-Komplexes.  
A: Bindung von fluoreszenzmarkiertem CCL5/RANTES an CCR1 auf der Zelloberfläche von CHO-CCR1-Zellen.  
B: Internalisierung des CCL5/RANTES-CCR1-Komplexes

Rezeptor und Ligand werden nach der Internalisierung zu Transferrin- und EEA-1 (*early endosome antigen-1*)-positiven *early endosomes* und dann zu perinukleären *recycling endosomes* transportiert (Signoret et al. 2005). Hierbei kommt es zu einer Dephosphorylierung des Rezeptors und zur Lösung des Rezeptor-Liganden-Komplexes. Der größte Teil der internalisierten Chemokinrezeptoren wird recycled und erscheint wieder an der Zelloberfläche. Ein kleiner Teil der Rezeptoren wird aber zusammen mit den Liganden in

den Lysosomen abgebaut. In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass es ca. 20min nach der Internalisierung zu einer erneuten Zunahme der Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors kommt, die nach ca. 60-120min ein Plateau mit ca. 80% des Ausgangswertes erreicht. Durch Untersuchung des Rezeptorrecyclings mit Cycloheximid, einem Hemmer der Proteinsynthese, konnte gezeigt werden, dass für die erneute Zunahme der Oberflächenexpression keine *de novo* Proteinsynthese notwendig ist.

Untersuchungen zum HIV-protectiven Effekt der CC-Chemokine CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES zeigten, dass die Liganden-induzierte Rezeptorinternalisierung hierfür ausschlaggebend ist (Mack et al. 1998; Brandt et al. 2002). Das N-terminal modifizierte AOP (Aminooxypentan)-RANTES besitzt eine besonders potente antivirale Wirkung (Simmons et al. 1997). Diese beruht auf einer gestörten endosomalen Trennung des AOP-RANTES/CCR5-Komplexes (Signoret et al. 2000). Hierbei kommt es nach einem Recycling an die Zelloberfläche zu einer raschen Re-Internalisierung, die sich in der Durchflusszytometrie als fehlende Zunahme der Oberflächenexpression darstellt (Mack et al. 1998). So kann CCR5 nicht mehr als funktioneller Rezeptor wirken. Sowohl die chemotaktische Zellmigration als auch die HIV-Infektion werden hierdurch verhindert (Signoret et al. 2000). AOP-RANTES führt auch bei Ccr5 zu einer Rezeptorinternalisierung (siehe auch Abb. 3-20). Interessanterweise zeigte sich aber für den murinen Ccr5 im Gegensatz zu dem humanen CCR5 ein normales Rezeptorrecycling nach Inkubation mit AOP-RANTES (Daten nicht gezeigt). Auch KS-vMIP-II (Kledal et al. 1997) hatte einen ganz unterschiedlichen Effekt auf den murinen Ccr5 als auf den humanen CCR5. KS-vMIP-II wirkt als Antagonist auf den humanen CCR5 und verhindert die CCR5-Internalisierung (Weber et al. 2001). In Internalisierungsversuchen führte KS-vMIP-II im Gegensatz hierzu zu einer Endozytose des murinen Ccr5.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Ccr2- bzw. Ccr5-überexprimierenden CHO-Zelllinien und die hier dargestellten Durchflusszytometrie-Protokolle zu Internalisierung und Recycling erlauben eine einfache Charakterisierung von Agonisten und Antagonisten. Die Zellen ermöglichten auch ein rasches Screenen von monoklonalen Antikörpern gegen Ccr2 bzw. Ccr5 (Mack et al. 2001).

## 4.2 AUSBLICK UND WEITERFÜHRENDE ARBEITEN

### 4.2.1 Chemokinrezeptoren als neue therapeutische Ziele

Aufgrund ihrer herausragenden Bedeutung bei der Migration, Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen sind Chemokinrezeptoren zu einem attraktiven Ziel neuer Therapieansätze geworden (Johnson et al. 2005; Mackay 2008). Es besteht die Hoffnung, im Gegensatz zu etablierten unspezifischen Immunsuppressiva, wie z.B. Glucokortikoide, gezielt einzelne Leukozytensubpopulationen therapeutisch beeinflussen zu können. Der Einsatz blockierender Antikörper sowie die Phänotypen von *knockout*-Mäusen haben gezeigt, dass die selektive Ausschaltung einzelner Chemokinrezeptoren einen großen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf bestimmter Krankheiten haben kann. Vielversprechend ist auch die Tatsache, dass die Chemokinrezeptoren zu der großen Familie der G-Protein gekoppelten 7 Transmembran-Rezeptoren (GPCR) gehören, für die schon eine Vielzahl von Medikamenten entwickelt worden sind (Brink et al. 2004). Derzeit wird an dem Einsatz von *small molecule* Antagonisten, modifizierten Chemokinen sowie Antikörper gegen Chemokinrezeptoren gearbeitet (Wells et al. 2006). Einzelne Chemokinrezeptor-Antagonisten haben schon den Sprung in die klinische Anwendung geschafft. So ist z.B. *Maraviroc*, ein *small molecule* CCR5-Antagonist, der als *HIV-entry inhibitor* wirkt, seit August 2007 von der US-FDA in der Kombinationstherapie von HIV-Infizierten mit R5-tropen HIV-1 zugelassen (Carter und Keating 2007).

Trotz aller Hoffnung liegt noch eine umfangreiche Arbeit in der genauen Klärung der Funktionen der einzelnen Komponenten des Chemokin/Chemokinrezeptor-Netzwerkes sowie der möglichen Folgen ihrer Modulation. Hierfür unerlässlich ist die Klärung der biologischen Rolle in homologen *in vivo* Modellen wie der Maus. Um Schlüsse ziehen zu können aus den Ergebnissen der murinen Physiologie und Pathophysiologie, muss die Chemokin/Chemokinrezeptor-Biologie hier ausreichend geklärt werden. Es müssen v.a. auch die Spezies-spezifischen Unterschiede berücksichtigt werden.

### 4.2.2 Die Maus als Modell für das humane Immunsystem

Die Maus hat sich aufgrund ihrer Größe, ihrer einfachen Haltung und vor allem auch der molekularbiologischen Möglichkeit *knockout*-Mäuse herzustellen als das am besten untersuchte Versuchstier etabliert. Die große Ähnlichkeit zwischen murinem und humanem Immunsystem erlaubt die experimentelle Untersuchung vieler medizinisch wichtiger Fragestellungen im Mausmodell. Aufgrund einiger signifikanter Unterschiede muss aber die Übertragbarkeit muriner Daten auf den Menschen im Einzelnen kritisch untersucht werden. Es finden sich z.B. Abweichungen bei den Defensinen, der Regulation von NK-Zellen, den Immunglobulin-Subklassen, der  $T_H1/T_H2$ -Differenzierung, der Fähigkeit von humanen T-Zellen und Endothelzellen, Antigene zu präsentieren, sowie dem relativen Anteil verschiedener Leukozyten-Subpopulationen (Mestas und Hughes 2004). Bei den Chemokinen

und Chemokinrezeptoren besteht eine große Homologie bezüglich Funktion, Struktur, Rezeptor-Liganden-Spezifitäten, Genorganisation und Genregulation. Aber auch hier bestehen einige wichtige Unterschiede. So konnten keine homologen Maus-Gene für den Chemokinrezeptor CXCR1 sowie für die inflammatorischen Chemokine CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CXCL11/I-TAC, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL23/MPIF-1, CCL24/ Eotaxin 2 oder CCL26/Eotaxin-3 gefunden werden. CCL16/LEC und CCL18/PARC findet man bei der Maus nur als nicht kodierende Pseudogene. Beim Menschen finden sich wiederum keine homologen Gene für die murinen Chemokine Cxcl15/Lungkine, Ccl16/MRP-1, Ccl9/MRP-2, Ccl12/mMCP-5. In einigen Fällen ist es nicht ganz einfach, ein exaktes Homolog zuzuordnen. So zeigt z.B. der murine Ccr2-Ligand Ccl12/mMCP-5 eine höhere Sequenzidentität (64,5%) zu dem humanen CCL2/MCP-1 als das designierte Homolog Ccl2/mMCP-1 (45%), welches sich v.a. aufgrund einer stark glykosylierten C-terminalen Extension von 49 Aminosäuren unterscheidet (Ernst et al. 1994; Gu et al. 1999). Trotzdem sprechen Spezifität und Funktionalität eindeutig für die biologische Korrelation von humanem und murinem MCP-1 (Rollins und Oppenheim 2001): In Southern Blot-Analysen bindet die murine Ccl2/mMCP-1 Probe selektiv und spezifisch an das humane CCL2/MCP-1. Hinzu kommt, dass das Expressionsmuster von Ccl2/mMCP-1, im Gegensatz zu Ccl12/mMCP-5, dem Expressionsmuster von humanem CCL2/MCP-1 entspricht. Zudem ist Ccl2/mMCP-1 ein potenterer Agonist für Ccr2 als Ccl12/mMCP-5. Betrachtet man nur die Exons 1 und 2, die nach Struktur/Aktivitäts-Studien ausschlaggebend für die biologische Aktivität sind, zeigen Ccl2/mMCP-1 und CCL2/MCP-1 die höchste Übereinstimmung (ca. 70% Identität).

Diese Unterschiede und Probleme reflektieren die Grenzen der Übertragbarkeit von Mausdaten auf den Menschen. Gerade deshalb ist es wichtig, die genauen physiologischen Rollen der einzelnen Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden sowie die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Maus und Mensch weiter herauszuarbeiten.

#### 4.2.3 Weiterführende Arbeiten

Polyklonale Peptidantikörper, wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Anti-mCCR2*- und *Anti-mCCR5-Immunsereen*, eignen sich meist gut, um Proteine in stabilen überexprimierenden Zelllinien *in vitro* zu detektieren. Aufgrund von niedriger Affinität und Kreuzreaktionen mit hohem Hintergrund erlauben sie aber meist keine Untersuchung primärer Zellen. Für die Untersuchung der physiologischen Expression von Chemokinrezeptoren auf Proteinebene sind deshalb spezifische monoklonale Antikörper (mAK) essentiell. Problematisch für die Herstellung von mAK gegen Zelloberflächenrezeptoren ist, dass nur eine kleine Peptidstruktur an der Zelloberfläche zugänglich ist und deshalb eine Peptid-Immunisierung häufig nicht zum Erfolg führt. Eine Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen, ist die Immunisierung mit Zellen, die den Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Voraussetzung für einen Erfolg ist hier aber ein sehr hohes Expressionsniveau,

das nur mit überexprimierenden Zellen erreicht wird. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit stabile Zelllinien hergestellt, die die murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 bzw. Ccr5 auf ihrer Oberfläche stark überexprimieren. Unter Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten Zellklone *CHO-mCCR2-Mtx100#4* und *CHO-mCCR5-Mtx100#1* gelang es M. Mack aus unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit J. Cihak von der Veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München in einer Folgearbeit, spezifische monoklonale Antikörper gegen Ccr2 bzw. Ccr5 herzustellen (Mack et al. 2001). Sie immunisierten *Wistar*-Ratten in 3-4 wöchigen Intervallen mindestens sechsmal mit jeweils  $10^7$  transfizierten CHO-Zellen. Vier Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen entnommen und Splenozyten mit *X63-Ag8*-Plasmazytomzellen fusioniert. Mit Hilfe der hier generierten *CHO-mCCR2*- und *CHO-mCCR5*-Zellen konnten die Hybridomzellen im Durchflusszytometer einfach auf ihre Bindungseigenschaften an Ccr2 bzw. Ccr5 gescreent werden. Aus 23 Fusionen wurden 3 mAK gegen Ccr2 und 15 mAK gegen Ccr5 identifiziert. Unter Verwendung der so hergestellten hochaffinen mAK *MC-21* (anti-Ccr2-IgG-2b) und *MC-68* (anti-Ccr5-IgG-2b) gelang eine erste Charakterisierung der Expression von Ccr2 und Ccr5 auf Proteinebene in der Maus (Mack et al. 2001). Das Expressionsmuster von Ccr2 in BALB/c-Mäusen war nahezu identisch mit dem von CCR2 beim Menschen. Etwa 5-15% der  $CD4^+$ -T-Zellen, 2-10% der  $CD8^+$ -T-Zellen und 98% der Monozyten exprimierten Ccr2. Im Gegensatz hierzu unterschied sich die Expression von Ccr5 in BALB/c-Mäusen deutlich von der Expression von CCR5 beim Menschen. So exprimierten 100% der murinen NK-Zellen Ccr5, wohingegen beim Menschen nur eine kleine NK-Zellpopulation CCR5-positiv war. Die Expression von Ccr5 auf T-Zellen und Monozyten war wieder vergleichbar mit der Expression von CCR5 beim Menschen. Etwa 10-40% der  $CD8^+$ -T-Zellen und 3-10% der  $CD4^+$ -T-Zellen exprimierten Ccr5 kräftig. Monozyten zeigten nur eine sehr schwache Ccr5-Expression.

In Mausmodellen entzündlicher Nierenerkrankungen fanden sich vermehrt Ccr2- und Ccr5- positive Lymphozyten. Bei der Apoferritin-induzierten Immunkomplex- Glomerulonephritis exprimierten 63% der eingewanderten  $CD4^+$ -T-Zellen Ccr2 und 69% Ccr5 sowie 30% der eingewanderten  $CD8^+$ -T-Zellen Ccr2 und sogar 92% Ccr5 (Mack et al. 2001). Bei der obstruktiven Nephropathie exprimierten 79% und bei der Lupus Nephritis sogar 90% der eingewanderten  $CD8^+$ -T-Zellen Ccr5 (Vielhauer et al. 2003). In einem murinen Autoimmun-Uveoretinitis-Modell konnte, unter Verwendung von *MC-21*, gezeigt werden, dass naive Monozyten erst 24-48h nach Verlassen des Knochenmarks Ccr2 exprimieren, dann in die entzündete Retina einwandern und nach 72h diesen Phänotyp wieder verlieren (Xu et al. 2005).

Aus den mAK *MC-21* und *MC-68* wurden in einer weiteren Arbeit rekombinante bispezifische Antikörper (bsAK) mit Spezifitäten gegen CD3 und Ccr2 bzw. CD3 und Ccr5 hergestellt (Schneider et al. 2005). Diese bsAK sollten über eine Aktivierung von zytotoxischen  $CD3^+$ -T-Zellen die selektive Depletion von Ccr2- bzw. Ccr5-positiven Zellen erlauben. Mit Hilfe der *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zellen konnte die spezifische



Bindung der bsAK an Ccr2 bzw. Ccr5 nachgewiesen und die *in vitro* Lyseaktivität untersucht werden.

In der hier etablierten Liganden-induzierten Rezeptorinternalisierung von *CHO-mCCR2*- bzw. *CHO-mCCR5*-Zellen konnten die monoklonalen Antikörper *MC-21* (Anti-Ccr2) und *MC-68* (Anti-Ccr5) als potente Rezeptor-Antagonisten charakterisiert werden. Sie blockierten die Wirkung von Ccl2/mMCP-1 auf Ccr2 bzw. Ccl3/mMIP-1 $\alpha$  auf Ccr5 nahezu vollständig. Der monoklonale Antikörper *MC-21* blockierte auch *in vivo* die Rekrutierung von Monozyten in einem Thioglykolat-Peritonitis-Modell (Mack et al. 2001). *MC-21* diente auch dazu, die Rolle von Ccr2 bei der Initiation und Progression der Kollagen-induzierten Arthritis in Mäusen zu untersuchen. Eine Blockade von Ccr2 während der Initiationsphase (Tag 0 bis 15) milderte den Verlauf der Arthritis deutlich ab, eine Blockade während der Progressionsphase (Tage 21 bis 36) führte aber zu einer deutlichen Verschlechterung des Verlaufs. Als Ursache wurde neben einer Depletion von Ccr2-positiven Monozyten eine immunmodulatorische Rolle von Ccr2-positiven regulatorischen T-Zellen diskutiert (Brühl et al. 2004; Quinones et al. 2005). In einer Folgearbeit konnte gezeigt werden, dass *MC-21* in hohen Dosen zu einer proinflammatorischen IL-6 Ausschüttung von Basophilen führte (Brühl et al. 2007). In einem Modell der polymikrobiellen septischen Peritonitis führte eine Blockade von Ccr2 durch *MC-21* zu einer reduzierten Einwanderung von Makrophagen und Neutrophilen in die Bauchhöhle. Zudem zeigte sich eine gesteigerte Synthese des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und eine deutlich verminderte Erregerelimination (Feterowski et al. 2004). *MC-21* konnte, ähnlich wie der *Ccr2-knockout*, die alveoläre Infiltration von Monozyten nach bronchoalveolärer Endotoxin-Instillation um mehr als 90% reduzieren (Maus et al. 2002; Maus et al. 2005). In einem Infektionsmodell mit *Streptococcus pneumoniae* führte die Blockade von Ccr2 durch *MC-21* zu einer fulminanten Pneumokokken-Pneumonie. *MC-21* verhinderte aber im gleichen Modell die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans Pneumonie in transgenen, Ccl2/mMCP-1-überexprimierenden Mäusen (Winter et al. 2007). In einem Maus-Modell des Typ 1 Diabetes mellitus konnten *MC-21* und *MC-68* die Einwanderung von autoreaktiven T<sub>H</sub>1-Zellen in das Pankreas nicht verhindern (Seifarth et al. 2006). In einem murinen Modell der Autoimmun-Uveoretinitis verminderte *MC-68* die retinale Infiltration von T<sub>H</sub>1-Zellen. Erstmals konnte hier *in vivo* demonstriert werden, dass Ccr5 für die transendotheliale Migration, aber nicht für das Rollen oder die endotheliale Adhäsion von T<sub>H</sub>1-Zellen verantwortlich ist (Crane et al. 2006).

Eine weitere Charakterisierung der Expression und Funktion von Ccr2 und Ccr5 in verschiedenen Maus-Modellen wird wichtige Einsichten in die Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen geben. Dieses Wissen wird helfen, die Daten von Experimenten mit *knockout*-Mäusen und Rezeptorantagonisten besser zu verstehen und interpretieren zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die beiden eng miteinander verwandten humanen Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 sind ganz wesentlich an der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen im Rahmen von Infektionen und entzündlichen Prozessen beteiligt. Sie vermitteln einen Teil der koordinierten zellulären Antwort auf die lokal sezernierten inflammatorischen Chemokine CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL7/MCP-3, CCL13/MCP-4, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  und CCL5/RANTES. Zudem hat sich CCR5 als wichtigster Corezeptor für die HIV-Infektion herausgestellt.

Die genaue Rolle der einzelnen Chemokine und Chemokinrezeptoren wird vor allem in murinen Krankheitsmodellen und *knockout*-Mäusen untersucht. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren lediglich die cDNA-Sequenzen der murinen Chemokinrezeptoren Ccr2 und Ccr5 veröffentlicht. Es gab nur wenige, vorläufige Daten zur mRNA-Expression, aber keine Daten zu Verteilung und Funktion der Rezeptoren auf Mauszellen, da keine Antikörper verfügbar waren. Um diese beiden Rezeptoren näher untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit stabile Zelllinien, die Ccr2 bzw. Ccr5 stabil auf ihrer Oberfläche exprimieren, hergestellt. Hierzu wurden die kodierenden Sequenzen für Ccr2 und Ccr5 aus genomischer Maus-DNA kloniert. Im Vergleich mit veröffentlichten Sequenzen fanden sich einige Punktmutationen, die als natürliche Polymorphismen interpretiert wurden. Expressionskonstrukte für Ccr2 und Ccr5 wurden unter Verwendung eines bicistronischen eukaryontischen Expressionsvektors hergestellt und die rekombinante DNA in *CHO/dhFr*<sup>-</sup>-Zellen durch Elektroporation eingeschleust. Die genomische Integration der Ccr2- und Ccr5-cDNA wurde mit PCR untersucht. Die Transkription wurde auf mRNA-Ebene mit RT-PCR kontrolliert. Mit einem polyklonalen *Anti-mCCR2*- bzw. *Anti-mCCR5*-Immunserum konnten die Ccr2- bzw. Ccr5-Proteine mittels Durchflusszytometrie auf der Zelloberfläche der transfizierten CHO-Zellen nachgewiesen werden. Zellklone mit einer hohen Oberflächenexpression der transfizierten Rezeptoren wurden isoliert und expandiert. In einem Gen-Amplifikationsschritt mit Methotrexat konnte eine weitere Steigerung der Rezeptorüberexpression erreicht werden. Um die Funktionalität der Rezeptoren zu beurteilen, wurde die Internalisierung und das Recycling von Ccr2 und Ccr5 in der Durchflusszytometrie untersucht.

Die so hergestellten und charakterisierten *CHO-mCCR2*- und *CHO-mCCR5*-Zelllinien dienten als Werkzeug für eine weitere *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von Ccr2 und Ccr5. Vor allem aber bildeten sie die Grundlage für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Ccr2 und Ccr5, die seither von vielen Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt im Rahmen ihrer Experimente erfolgreich eingesetzt wurden.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

- Aarden, L., Brunner, T. und Cerottini, J. (1979). "Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors." J Immunol **123**(6): 2928-9.
- Abdi, R., Smith, R. N., Makhlof, L., Najafian, N., Luster, A. D., Auchincloss, H., Jr. und Sayegh, M. H. (2002). "The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) in islet allograft rejection." Diabetes **51**(8): 2489-95.
- Adams, D. H. und Lloyd, A. R. (1997). "Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines." Lancet **349**(9050): 490-5.
- Albright, A. V., Shieh, J. T., Itoh, T., Lee, B., Pleasure, D., O'Connor, M. J., Doms, R. W. und Gonzalez-Scarano, F. (1999). "Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates." J Virol **73**(1): 205-213.
- Algood, H. M. und Flynn, J. L. (2004). "CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration." J Immunol **173**(5): 3287-96.
- Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G. B. und Sher, A. (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells." Nat Immunol **1**(1): 83-7.
- Alkhatib, G. und Berger, E. A. (2007). "HIV coreceptors: From discovery and designation to new paradigms and promise." Eur J Med Res **12**(9): 375-383.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. und Berger, E. A. (1996). "CCR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-1958.
- Allavena, P., Sica, A., Vecchi, A., Locati, M., Sozzani, S. und Mantovani, A. (2000). "The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues." Immunol Rev **177**: 141-9.
- Anders, H. J., Vielhauer, V. und Schlöndorff, D. (2003). "Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease." Kidney Int **63**(2): 401-15.
- Andres, P. G., Beck, P. L., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Bhan, A. K., Dawson, T., Kuziel, W. A., Maeda, N., MacDermott, R. P., Podolsky, D. K. und Reinecker, H. C. (2000). "Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine." J Immunol **164**(12): 6303-6312.
- Aragay, A. M., Mellado, M., Frade, J. M., Martin, A. M., Jimenez-Sainz, M. C., Martinez, A. C. und Mayor, F., Jr. (1998). "Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2985-90.
- Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. und Yokota, T. (1990). "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses." Annu Rev Biochem **59**: 783-836.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. New York, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Azzawi, M., Hasleton, P. S., Geraghty, P. J., Yonan, N., Krysiak, P., El Gammal, A., Deiraniya, A. und Hutchinson, I. (1998). "RANTES chemokine expression is related to acute cardiac cellular rejection and infiltration by CD45RO T-lymphocytes and macrophages." J Heart Lung Transplant **17**(9): 881-887.

- Badewa, A. P., Quinton, L. J., Shellito, J. E. and Mason, C. M. (2005). "Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **85**(3): 185-95.
- Baggiolini, M. (2001). "Chemokines in pathology and medicine." J Intern Med **250**(2): 91-104.
- Baggiolini, M. und Dahinden, C. A. (1994). "CC chemokines in allergic inflammation." Immunol Today **15**(3): 127-33.
- Baggiolini, M. und Loetscher, P. (2000). "Chemokines in inflammation and immunity." Immunol Today **21**(9): 418-20.
- Baggiolini, M., Walz, A. und Kunkel, S. L. (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." J Clin Invest **84**(4): 1045-9.
- Baldwin, J. M. (1993). "The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors." EMBO J **12**(4): 1693-703.
- Belperio, J. A., Keane, M. P., Burdick, M. D., Lynch, J. P., 3rd, Xue, Y. Y., Berlin, A., Ross, D. J., Kunkel, S. L., Charo, I. F. und Strieter, R. M. (2001). "Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome." J Clin Invest **108**(4): 547-56.
- Ben-Baruch, A., Michiel, D. F. und Oppenheim, J. J. (1995). "Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells." J Biol Chem **270**(20): 11703-6.
- Bennetts, B. H., Teutsch, S. M., Buhler, M. M., Heard, R. N. und Stewart, G. J. (1997). "The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis." Hum Immunol **58**(1): 52-9.
- Berger, O., Gan, X., Gujuluva, C., Burns, A. R., Sulur, G., Stins, M., Way, D., Witte, M., Weinand, M., Said, J., Kim, K. S., Taub, D., Graves, M. C. und Fiala, M. (1999). "CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia." Mol Med **5**(12): 795-805.
- Bird, J. E., Giancarli, M. R., Kurihara, T., Kowala, M. C., Valentine, M. T., Gitlitz, P. H., Pandya, D. G., French, M. H. und Durham, S. K. (2000). "Increased severity of glomerulonephritis in C-C chemokine receptor 2 knockout mice." Kidney Int **57**(1): 129-36.
- Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." Methods Enzymol **100**: 243-55.
- Blanpain, C., Lee, B., Tackoen, M., Puffer, B., Boom, A., Libert, F., Sharron, M., Wittamer, V., Vassart, G., Doms, R. W. und Parmentier, M. (2000). "Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations." Blood **96**(5): 1638-45.
- Blanpain, C., Migeotte, I., Lee, B., Vakili, J., Doranz, B. J., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R. W. und Parmentier, M. (1999). "CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist." Blood **94**(6): 1899-905.
- Blanpain, C., Parmentier, M. und Oppenheim, J. J. (2001). "CCR5." In Cytokine Reference, Academic Press: 2067-2080.
- Blease, K., Mehrad, B., Standiford, T. J., Lukacs, N. W., Gosling, J., Boring, L., Charo, I. F., Kunkel, S. L. und Hogaboam, C. M. (2000). "Enhanced pulmonary allergic responses to Aspergillus in CCR2-/- mice." J Immunol **165**(5): 2603-2611.
- Bloom, B. R. und Bennett, B. (1966). "Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity." Science **153**(731): 80-2.
- Boring, L., Gosling, J., Chensue, S. W., Kunkel, S. L., Farese, R. V., Jr., Broxmeyer, H. E. und Charo, I. F. (1997). "Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice." J Clin Invest **100**(10): 2552-61.

- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. und Charo, I. F. (1998). "Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-897.
- Boring, L., Gosling, J., Monteclaro, F. S., Lusis, A. J., Tsou, C. L. und Charo, I. F. (1996). "Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1alpha receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9." J Biol Chem **271**(13): 7551-8.
- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigens on polymorphonuclear leukocytes." J Exp Med **115**: 453.
- Brandt, S. M., Mariani, R., Holland, A. U., Hope, T. J. und Landau, N. R. (2002). "Association of chemokine-mediated block to HIV entry with coreceptor internalization." J Biol Chem **277**(19): 17291-9.
- Braun, M.C., Lahey, E. und Kelsall, B.L. (2000). "Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants." J Immunol **164**(6): 3009-3017.
- Braunersreuther, V., Zerneck, A., Arnaud, C., Liehn, E. A., Steffens, S., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Burger, F., Pelli, G., Luckow, B., Mach, F. und Weber, C. (2007). "Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(2): 373-9.
- Brink, C. B., Harvey, B. H., Bodenstein, J., Venter, D. P., Oliver, D. W. (2004). "Recent advances in drug action and therapeutics: relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology." Br J Clin Pharmacol **57**(4): 373-387.
- Browning, J., Horner, J. W., Pettoello-Mantovani, M., Raker, C., Yurasov, S., DePinho, R. A. und Goldstein, H. (1997). "Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection." Proc Natl Acad Sci USA **94**(26): 14637-14641.
- Brühl, H., Cihak, J., Plachy, J., Kunz-Schughart, L., Niedermeier, M., Denzel, A., Rodriguez Gomez, M., Talke, Y., Luckow, B., Stangassinger, M. und Mack, M. (2007). "Targeting of Gr-1<sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup> monocytes in collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **56**(9): 2975-2985.
- Brühl, H., Cihak, J., Schneider, M. A., Plachy, J., Rupp, T., Wenzel, I., Shakarami, M., Milz, S., Ellwart, J. W., Stangassinger, M., Schlöndorff, D. und Mack, M. (2004). "Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2<sup>+</sup> T cells." J Immunol **172**(2): 890-8.
- Brühl, H., Wagner, K., Kellner, H., Schattenkirchner, M., Schlöndorff, D. und Mack, M. (2001). "Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases." Clin Exp Immunol **126**(3): 551-559.
- Burgstahler, R. (1997). "Der Chemokin-Rezeptor BLR2/CCR7: Differenzierungs-abhängige und Epstein-Barr-Virus-induzierte Expression auf Lymphozyten", Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bush, E., Maeda, N., Kuziel, W. A., Dawson, T. C., Wilcox, J. N., DeLeon, H. und Taylor, W. R. (2000). "CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension." Hypertension **36**(3): 360-363.
- Cadillac, J. M., Sigler, R. E., Weinberg, J. B., Lutzke, M. L. und Rochford, R. (2005). "Gammaherpesvirus-induced lung pathology is altered in the absence of macrophages." Lung **183**(4): 239-51.
- Campbell, E. M., Charo, I. F., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Boring, L., Gosling, J. und Lukacs, N. W. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2<sup>-/-</sup> mice: the role of mast cells." J Immunol **163**(4): 2160-7.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. und Williamson, B. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci USA **72**(9): 3666-70.

- Carter, N. J. und Keating, G. M. (2007). "Maraviroc." Drugs **67**(15): 2277-88.
- Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C. und Germain, R. N. (2006). "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction." Nature **440**(7086): 890-5.
- Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A. und Vicari, A. (2000). "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." Springer Semin Immunopathol **22**(4): 345-69.
- Charo, I. F., Myers, S. J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A. J. und Coughlin, S. R. (1994). "Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails." Proc Natl Acad Sci USA **91**(7): 2752-6.
- Charo, I. F. und Ransohoff, R. M. (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." N Engl J Med **354**(6): 610-21.
- Chen, B. P., Kuziel, W. A. und Lane, T. E. (2001). "Lack of CCR2 results in increased mortality and impaired leukocyte activation and trafficking following infection of the central nervous system with a neurotropic coronavirus." J Immunol **167**(8): 4585-92.
- Chensue, S. W., Warmington, K. S., Ruth, J. H., Sanghi, P. S., Lincoln, P. und Kunkel, S. L. (1996). "Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production." J Immunol **157**(10): 4602-4608.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. und Sodroski, J. (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." Cell **85**(7): 1135-48.
- Clapham, P. R., Blanc, D. und Weiss, R. A. (1991). "Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus." Virology **181**(2): 703-15.
- Clore, G. M. und Gronenborn, A. M. (1995). "Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines." FASEB J **9**(1): 57-62.
- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. und Lusso, P. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-5.
- Cochran, B. H., Reffel, A. C. und Stiles, C. D. (1983). "Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor." Cell **33**(3): 939-47.
- Cohen, S., Bigazzi, P. E. und Yoshida, T. (1974). "Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production." Cell Immunol **12**(1): 150-9.
- Cohnheim, J. (1867). "Über Entzündung und Eiterung." Virchows Arch A **40**: 1-79.
- Combadiere, C., Ahuja, S. K. und Murphy, P. M. (1995). "Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor [Erratum in J Biol Chem 1995 Dec 15;270(50):30235]." J Biol Chem **270**(28): 16491-4.
- Combadiere, C., Ahuja, S. K., Tiffany, H. L. und Murphy, P. M. (1996). "Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES." J Leukoc Biol **60**(1): 147-152.

- Combadiere, C., Gao, J., Tiffany, H. L. und Murphy, P. M. (1998). "Gene cloning, RNA distribution, and functional expression of mCX3CR1, a mouse chemotactic receptor for the CX3C chemokine fractalkine." Biochem Biophys Res Commun **253**(3): 728-732.
- Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Eppig, J. T., Maltais, L. J., Miller, J. C., Dietrich, W. F., Weaver, A., Lincoln, S. E. und Steen, R. G. (1993). "A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects." Science **262**(5130): 57-66.
- Craggs, A., Welfare, M., Donaldson, P. T. und Mansfield, J. C. (2001). "The CC chemokine receptor 5 delta32 mutation is not associated with IBD in NE England." Genes Immun **2**(2): 114-116.
- Crane, I. J., Xu, H., Wallace, C., Manivannan, A., Mack, M., Liversidge, J., Marquez, G., Sharp, P. F. und Forrester, J. V. (2006). "Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis." J Leukoc Biol **79**(3): 435-43.
- Czarnetzki, B. M. und Benveniste, J. (1981). "Effect of 1-O-octadecyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF-acether) on leukocytes I. Analysis of the in vitro migration of human neutrophils." Chem Phys Lipids **29**(4): 317-26.
- Dairaghi, D. J., Franz-Bacon, K., Callas, E., Cupp, J., Schall, T. J., Tamraz, S. A., Boehme, S. A., Taylor, N. und Bacon, K. B. (1998). "Macrophage inflammatory protein-1beta induces migration and activation of human thymocytes." Blood **91**(8): 2905-2913.
- Danoff, T. M., Lalley, P. A., Chang, Y. S., Heeger, P. S. und Neilson, E. G. (1994). "Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the Scya5 gene encoding the murine chemokine RANTES." J Immunol **152**(3): 1182-1189.
- Davatelis, G., Tekamp-Olson, P., Wolpe, S. D., Hermsen, K., Luedke, C., Gallegos, C., Coit, D., Merryweather, J. und Cerami, A. (1988). "Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties." J Exp Med **167**(6): 1939-44.
- Dawson, T. C., Beck, M. A., Kuziel, W. A., Henderson, F. und Maeda, N. (2000). "Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus." Am J Pathol **156**(6): 1951-1959.
- Dawson, T. C., Kuziel, W. A., Osahar, T. A. und Maeda, N. (1999). "Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Atherosclerosis **143**(1): 205-211.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R. und O'Brien, S. J. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene." Science **273**(5283): 1856-62.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. und Landau, N. R. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
- Deuel, T. F., Keim, P. S., Farmer, M. und Henrikson, R. L. (1977). "Amino acid sequence of human platelet factor 4." Proc Natl Acad Sci USA **74**(6): 2256-8.
- Dinareello, C. A. (1984). "Interleukin-1." Rev Infect Dis **6**(1): 51-95.
- Doms, R. und Moore, J. P. (2000). "HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity." J Cell Biol **151**(2): F9-14.
- Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. und Doms, R. W. (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-58.



- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-45.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. und Paxton, W. A. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.
- Dumonde, D. C., Wolstencroft, R. A., Panayi, G. S., Matthew, M., Morley, J. und Howson, W. T. (1969). "'Lymphokines': non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation." Nature **224**(214): 38-42.
- Duncan, S. R., Scott, S. und Duncan, C. J. (2005). "Reappraisal of the historical selective pressures for the CCR5-Delta32 mutation." J Med Genet **42**(3): 205-8.
- Dunzendorfer, S., Kaneider, N. C., Kaser, A., Woell, E., Frade, J. M., Mellado, M., Martinez-Alonso, C. und Wiedermann, C. J. (2001). "Functional expression of chemokine receptor 2 by normal human eosinophils." J Allergy Clin Immunol **108**(4): 581-587.
- Ernst, C. A., Zhang, Y. J., Hancock, P. R., Rutledge, B. J., Corless, C. L. und Rollins, B. J. (1994). "Biochemical and biologic characterization of murine monocyte chemoattractant protein-1. Identification of two functional domains." J Immunol **152**(7): 3541-3549.
- Elvin, S. J., Williamson, E. D., Scott, J. C., Smith, J. N., Perez de Lema, G., Chilla, S., Clapham, P., Pfeffer, K., Schlöndorff, D. und Luckow, B. (2004). "Evolutionary genetics: Ambiguous role of CCR5 in *Y. pestis* infection." Nature **430**(6998): 417.
- Fairbrother, W., Skelton, N. und Horuk, R. (1996). "Three-dimensional structures of the chemokine family." In Chemoattractant Ligands and their Receptors. M. Hollinger. Boca Raton, Florida, CRC Press: 55-86.
- Fantuzzi, L., Borghi, P., Ciolli, V., Pavlakis, G., Belardelli, F. und Gessani, S. (1999). "Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response." Blood **94**(3): 875-83.
- Faussner, A., Bauer, A., Kalatskaya, I., Jochum, M. und Fritz, H. (2003). "Expression levels strongly affect ligand-induced sequestration of B2 bradykinin receptors in transfected cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(6): H1892-8.
- Feterowski, C., Mack, M., Weighardt, H., Bartsch, B., Kaiser-Moore, S. und Holzmann, B. (2004). "CC chemokine receptor 2 regulates leukocyte recruitment and IL-10 production during acute polymicrobial sepsis." Eur J Immunol **34**(12): 3664-73.
- Fife, B. T., Huffnagle, G. B., Kuziel, W. A. und Karpus, W. J. (2000). "CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **192**(6): 899-905.
- Fischereder, M. und Luckow, B., Hocher, B., Wüthrich, R. P., Rothenpieler, U., Schneeberger, H., Panzer, U., Stahl, R. A., Hauser, I. A., Budde, K., Neumayer, H., Kramer, B. K., Land, W. und Schlöndorff, D. (2001). "CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival." Lancet **357**(9270): 1758-61.
- Ford-Hutchinson, A. W., Bray, M. A., Doig, M. V., Shipley, M. E. und Smith, M. J. (1980). "Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes." Nature **286**(5770): 264-5.
- Freshney, I. (1994). Culture of Animal Cells: A manual of basic techniques. 3<sup>rd</sup> Ed., New York, J. Wiley & Sons.
- Frade, J. M., Mellado, M., del Real, G., Gutierrez-Ramos, J. C., Lind, P. und Martinez, A. C. (1997). "Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells." J Immunol **159**(11): 5576-84.

- Franchin, G., Zybarth, G., Dai, W. W., Dubrovsky, L., Reiling, N., Schmidtmayerova, H., Bukrinsky, M. und Sherry, B. (2000). "Lipopolysaccharide inhibits HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages through direct and sustained down-regulation of CC chemokine receptor 5." J Immunol **164**(5): 2592-2601.
- Fujinaka, H., Yamamoto, T., Takeya, M., Feng, L., Kawasaki, K., Yaoita, E., Kondo, D., Wilson, C. B., Uchiyama, M. und Kihara, I. (1997). "Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats." J Am Soc Nephrol **8**(7): 1174-1178.
- Furie, M. B. und Randolph, G. J. (1995). "Chemokines and tissue injury." Am J Pathol **146**(6): 1287-301.
- Furuichi, K., Wada, T., Iwata, Y., Kitagawa, K., Kobayashi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Wang, H., Matsushima, K., Takeya, M., Kuziel, W. A., Mukaida, N. und Yokoyama, H. (2003). "CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney." J Am Soc Nephrol **14**(10): 2503-15.
- Gambelunghe, G., Ghaderi, M., Brozzetti, A., Del Sindaco, P., Gharizadeh, B., Nyren, P., Hjelmstrom, P., Nikitina-Zake, L., Sanjeevi, C. B. und Falorni, A. (2003). "Lack of association of CCR2-64I and CCR5-Delta 32 with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults." Hum Immunol **64**(6): 629-32.
- Gao, J. L., Kuhns, D. B., Tiffany, H. L., McDermott, D., Li, X., Francke, U. und Murphy, P. M. (1993). "Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor." J Exp Med **177**(5): 1421-1427.
- Gao, W., Faia, K. L., Csizmadia, V., Smiley, S. T., Soler, D., King, J. A., Danoff, T. M. und Hancock, W. W. (2001). "Beneficial effects of targeting CCR5 in allograft recipients." Transplantation **72**(7): 1199-1205.
- Garcia-Zepeda, E. A., Combadiere, C., Rothenberg, M. E., Sarafi, M. N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P. M. und Luster, A. D. (1996). "Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3." J Immunol **157**(12): 5613-26.
- Gaupp, S., Pitt, D., Kuziel, W. A., Cannella, B. und Raine, C. (2003). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in CCR2 (-/-) mice: susceptibility in multiple strains." Am J Pathol **162**(1): 139-50.
- Gerard, C. und Rollins, B. J. (2001). "Chemokines and disease." Nat Immunol **2**(2): 108-15.
- Gery, I., Gershon, R. K. und Waksman, B. H. (1971). "Potentiation of cultured mouse thymocyte responses by factors released by peripheral leucocytes." J Immunol **107**(6): 1778-80.
- Gharaee-Kermani, M., Denholm, E. M. und Phan, S. H. (1996). "Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors." J Biol Chem **271**(30): 17779-84.
- Gharaee-Kermani, M., McCullumsmith, R. E., Charo, I. F., Kunkel, S. L. und Phan, S. H. (2003). "CC-chemokine receptor 2 required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Cytokine **24**(6): 266-76.
- Glass, W. G., Lim, J. K., Cholera, R., Pletnev, A. G., Gao, J. L. und Murphy, P. M. (2005). "Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection." J Exp Med **202**(8): 1087-98.
- Glass, W. G., Liu, M. T., Kuziel, W. A. und Lane, T. E. (2001). "Reduced macrophage infiltration and demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic coronavirus." Virology **288**(1): 8-17.
- Glass, W. G., McDermott, D. H., Lim, J. K., Lekhong, S., Yu, S. F., Frank, W. A., Pape, J., Cheshier, R. C. und Murphy, P. M. (2006). "CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection." J Exp Med **203**(1): 35-40.

- Gomez-Reino, J. J., Pablos, J. L., Carreira, P. E., Santiago, B., Serrano, L., Vicario, J. L., Balsa, A., Figueroa, M. und de Juan, M. D. (1999). "Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5." Arthritis Rheum. **42**(5): 989-992.
- Gong, W., Howard, O. M., Turpin, J. A., Grimm, M. C., Ueda, H., Gray, P. W., Raport, C. J., Oppenheim, J. J. und Wang, J. M. (1998). "Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry/replication." J Biol Chem **273**(8): 4289-4292.
- Gonzalez, P., Alvarez, R., Batalla, A., Reguero, J. R., Alvarez, V., Astudillo, A., Cubero, G. I., Cortina, A. und Coto, E. (2001). "Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction." Genes Immun **2**(4): 191-5.
- Grandaliano, G., Gesualdo, L., Ranieri, E., Monno, R., Montinaro, V., Marra, F. und Schena, F. P. (1996). "Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment." J Am Soc Nephrol. **7**(6): 906-913.
- Green, J. A., Cooperband, S. R. und Kibrick, S. (1969). "Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes." Science **164**(886): 1415-7.
- Gröne, H. J., Weber, C., Weber, K. S., Gröne, E. F., Rabelink, T., Klier, C. M., Wells, T. N., Proudfoot, A. E., Schlöndorff, D. und Nelson, P. J. (1999). "Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment." FASEB J **13**(11): 1371-83.
- Gross-Bellard, M., Oudet, P. und Chambon, P. (1973). "Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells." Eur J Biochem **36**(1): 32-8.
- Grove, M. und Plumb, M. (1993). "C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene." Mol Cell Biol **13**(9): 5276-5289.
- Gu, L., Tseng, S. C. und Rollins, B. J. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1." Chem.Immunol. **72**: 7-29.
- Guignard, F., Combadiere, C., Tiffany, H. L. und Murphy, P. M. (1998). "Gene organization and promoter function for CC chemokine receptor 5 (CCR5)." J Immunol **160**(2): 985-992.
- Guo, J., van Eck, M., de Waard, V., Maeda, N., Benson, G. M., Groot, P. H. und van Berkel, T. J. (2005). "The presence of leukocyte CC-chemokine receptor 2 in CCR2 knockout mice promotes atherogenesis." Biochim Biophys Acta **1740**(3): 453-9.
- Han, K. H., Tangirala, R. K., Green, S. R. und Quehenberger, O. (1998). "Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(12): 1983-1991.
- Hancock, W. W., Gao, W., Faia, K. L. und Csizmadia, V. (2000). "Chemokines and their receptors in allograft rejection." Curr Opin Immunol **12**(5): 511-516.
- Handel, T. und Domaille, P. (1996). "Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer." Biochemistry **35**(21): 6569-84.
- Hariharan, D., Douglas, S. D., Lee, B., Lai, J. P., Campbell, D. E. und Ho, W. Z. (1999). "Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes." Blood **93**(4): 1137-44.
- Hayasaki, T., Kaikita, K., Okuma, T., Yamamoto, E., Kuziel, W. A., Ogawa, H. und Takeya, M. (2006). "CC chemokine receptor-2 deficiency attenuates oxidative stress and infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in mice." Circ J **70**(3): 342-51.
- Heinrich, J. N., Ryseck, R., Macdonald-Bravo, H. und Bravo, R. (1993). "The product of a novel growth factor-activated gene, fic, is a biologically active "C-C"-type cytokine." Mol Cell Biol **13**(4): 2020-30.

- Herrmann, B. G. und Frischauf, A. M. (1987). "Isolation of genomic DNA." Methods Enzymol **152**: 180-3.
- Hogaboam, C. M., Bone-Larson, C. L., Lipinski, S., Lukacs, N. W., Chensue, S. W., Strieter, R. M. und Kunkel, S. L. (1999). "Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models." J Immunol **163**(4): 2193-201.
- Hogaboam, C. M., Carpenter, K. J., Schuh, J. M., Proudfoot, A. A., Bridger, G. und Buckland, K. F. (2005). "The therapeutic potential in targeting CCR5 and CXCR4 receptors in infectious and allergic pulmonary disease." Pharmacol Ther **107**(3): 314-28.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." Anal Biochem **114**(1): 193-7.
- Holmes, W. E., Lee, J., Kuang, W. J., Rice, G. C. und Wood, W. I. (1991). "Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor." Science **253**(5025): 1278-80.
- Horuk, R. (1994). "Molecular properties of the chemokine receptor family." Trends Pharmacol Sci **15**(5):159-65.
- Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N. R., Phair, J., Ho, D. D. und Koup, R. A. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **2**(11): 1240-1243.
- Huffnagle, G. B., McNeil, L. K., McDonald, R. A., Murphy, J. W., Toews, G. B., Maeda, N. und Kuziel, W. A. (1999). "Cutting edge: Role of C-C chemokine receptor 5 in organ-specific and innate immunity to *Cryptococcus neoformans*." J Immunol **163**(9): 4642-4646.
- Iikura, M., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Kawasaki, H., Matsushima, K., Kitaura, M., Morita, Y., Yoshie, O., Yamamoto, K. und Hirai, K. (2001). "Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4." J Leukoc Biol **70**(1): 113-120.
- Isaacs, A. und Lindenmann, J.(1957)."Virus interference I. The interferons." Proc R Soc Lond (Biol) **147**:258-67.
- Ishibashi, M., Hiasa, K., Zhao, Q., Inoue, S., Ohtani, K., Kitamoto, S., Tsuchihashi, M., Sugaya, T., Charo, I. F., Kura, S., Tsuzuki, T., Ishibashi, T., Takeshita, A. und Egashira, K. (2004). "Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling." Circ Res **94**(9): 1203-10.
- Izikson, L., Klein, R. S., Charo, I. F., Weiner, H. L. und Luster, A. D. (2000). "Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2." J Exp Med **192**(7): 1075-80.
- Janis, K., Hoeltke, J., Nazareth, M., Fanti, P., Poppenberg, K. und Aronica, S. M. (2004). "Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes." Am J Reprod Immunol **51**(1): 22-31.
- Jia, G. Q., Gonzalo, J. A., Lloyd, C., Kremer, L., Lu, L., Martinez, A., Wershil, B. K. und Gutierrez-Ramos, J. C. (1996). "Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation." J Exp Med **184**(5): 1939-1951.
- Johnson, Z., Schwarz, M., Power, A. E., Wells, T. N., Proudfoot, A. E. (2005). "Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system." Trends Immunol **26**(5): 268-274.
- Kaikita, K., Hayasaki, T., Okuma, T., Kuziel, W. A., Ogawa, H. und Takeya, M. (2004). "Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction." Am J Pathol **165**(2): 439-47.

- Karpus, W. J. und Kennedy, K. J. (1997). "MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation." J Leukoc Biol **62**(5): 681-687.
- Kaufman, R. J. (1990). "Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells." Methods Enzymol **185**: 537-66.
- Kaufman, R. J., Murtha, P. und Davies, M. V. (1987). "Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells." EMBO J **6**(1): 187-93.
- Kaufman, R. J. und Sharp, P. A. (1982). "Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary dna gene." J Mol Biol **159**(4): 601-21.
- Kaufmann, A., Salentin, R., Gemsa, D. und Sprenger, H. (2001a). "Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages." J Leukoc Biol **69**(2): 248-252.
- Kaufmann, A., Salentin, R., Meyer, R. G., Bussfeld, D., Pauligk, C., Fesq, H., Hofmann, P., Nain, M., Gemsa, D. und Sprenger, H. (2001b). "Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system." Immunobiology **204**(5): 603-613.
- Keohavong, P. und Thilly, W. G. (1989). "Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification." Proc Natl Acad Sci USA **86**(23): 9253-7.
- Khan, I. A., Thomas, S. Y., Moretto, M. M., Lee, F. S., Islam, S. A., Combe, C., Schwartzman, J. D. und Luster, A. D. (2006). "CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection." PLoS Pathog **2**(6): e49.
- Kim, Y., Sung, S., Kuziel, W. A., Feldman, S., Fu, S. M. und Rose, C. E., Jr. (2001). "Enhanced airway Th2 response after allergen challenge in mice deficient in CC chemokine receptor-2 (CCR2)." J Immunol **166**(8): 5183-5192.
- Kitagawa, K., Wada, T., Furuichi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Takeya, M., Kuziel, W. A., Matsushima, K., Mukaida, N. und Yokoyama, H. (2004). "Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney." Am J Pathol **165**(1): 237-46.
- Kledal, T. N., Rosenkilde, M. M., Coulin, F., Simmons, G., Johnsen, A. H., Alouani, S., Power, C. A., Lutichau, H. R., Gerstoft, J., Clapham, P. R., Clark-Lewis, I., Wells, T. N. C. und Schwartz, T. W. (1997). "A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." Science **277**(5332): 1656-9.
- Kopydlowski, K. M., Salkowski, C. A., Cody, M. J., van Rooijen, N., Major, J., Hamilton, T. A. und Vogel, S. N. (1999). "Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo." J Immunol **163**(3): 1537-1544.
- Kornbluth, R. S., Kee, K. und Richman, D. D. (1998). "CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines." Proc Natl Acad Sci USA **95**(9): 5205-5210.
- Kostrikis, L. G., Huang, Y., Moore, J. P., Wolinsky, S. M., Zhang, L., Guo, Y., Deutsch, L., Phair, J., Neumann, A. U. und Ho, D. D. (1998). "A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation." Nat Med **4**(3): 350-3.
- Kownatzki, e., Kapp, A. und Urich, S. (1986). "Novel neutrophil chemotactic factor derived from human peripheral blood mononuclear leucocytes." Clin Exp Immunol **64**(1): 214-22.
- Kucharzik, T., Lugerling, N., Pauels, H. G., Domschke, W. und Stoll, R. (1998). "IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells." Clin Exp Immunol **111**(1): 152-157.

- Kuhmann, S. E., Madani, N., Diop, O. M., Platt, E. J., Morvan, J., Muller-Trutwin, M. C., Barre-Sinoussi, F. und Kabat, D. (2001). "Frequent substitution polymorphisms in African green monkey CCR5 cluster at critical sites for infections by simian immunodeficiency virus SIVagm, implying ancient virus-host coevolution." J.Virol. **75**(18): 8449-8460.
- Kuhmann, S. E., Platt, E. J., Kozak, S. L. und Kabat, D. (1997). "Polymorphisms in the CCR5 genes of African green monkeys and mice implicate specific amino acids in infections by simian and human immunodeficiency viruses." J.Virol. **71**(11): 8642-8656.
- Kunkel, E. J. und Butcher, E. C. (2002). "Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes." Immunity **16**(1): 1-4.
- Kurihara, T. und Bravo, R. (1996). "Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the CC-chemokines JE and FIC." J Biol Chem **271**(20): 11603-7.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J. und Bravo, R. (1997). "Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor." J Exp Med **186**(10): 1757-1762.
- Kuziel, W. A., Dawson, T. C., Quinones, M., Garavito, E., Chenuaux, G., Ahuja, S. S., Reddick, R. L. und Maeda, N. (2003). "CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherosclerosis in apoE knockout mice." Atherosclerosis **167**(1): 25-32.
- Kuziel, W. A., Morgan, S. J., Dawson, T. C., Griffin, S., Smithies, O., Ley, K. und Maeda, N. (1997). "Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2." Proc Natl Acad Sci USA **94**(22): 12053-12058.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. und Hendrickson, W. A. (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." Nature **393**(6686): 648-59.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lalani, A. S., Masters, J., Zeng, W., Barrett, J., Pannu, R., Everett, H., Arendt, C. W. und McFadden, G. (1999). "Use of chemokine receptors by poxviruses." Science **286**(5446): 1968-71.
- Levy, J. A. (1996). "Infection by human immunodeficiency virus - CD4 is not enough." N Engl J Med **338**(7):436-45.
- Li, M., Carpio, D. F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R. M. und Beg, A. A. (2001). "An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells." J Immunol **166**(12): 7128-35.
- Libert, F., Cochaux, P., Beckman, G., Samson, M., Aksenova, M., Cao, A., Czeizel, A., Claustres, M., de la Rua, C., Ferrari, M., Ferrec, C., Glover, G., Grinde, B., Guran, S., Kucinkas, V., Lavinha, J., Mercier, B., Ogur, G., Peltonen, L., Rosatelli, C., Schwartz, M., Spitsyn, V., Timar, L., Beckman, L., Parmentier, M. und Vassart, G. (1998). "The deltaCCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe." Hum Mol Genet **7**(3): 399-406.
- Libert, F., Parmentier, M., Lefort, A., Dinsart, C., van Sande, J., Maenhaut, C., Simons, M. J., Dumont, J. E. und Vassart, G. (1989). "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family." Science **244**(4904): 569-72.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P. M. und Hiscott, J. (1999). "Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription." Mol Cell Biol **19**(2): 959-966.
- Lindley, I., Westwick, J. und Kunkel, S. (1993). "Nomenclature announcement - the chemokines." Immunol. Today **14**: 24.

- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A. und Landau, N. R. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell **86**(3): 367-77.
- Liu, R., Zhao, X., Gurney, T. A. und Landau, N. R. (1998). "Functional analysis of the proximal CCR5 promoter." AIDS Res Hum Retroviruses **14**(17): 1509-1519.
- Lloyd, C. M., Dorf, M. E., Proudfoot, A., Salant, D. J. und Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). "Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis." J Leukoc Biol **62**(5): 676-680.
- Loetscher, P., Moser, B. und Baggiolini, M. (2000). "Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection." Adv Immunol **74**: 127-80.
- Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M. und Moser, B. (1996). "Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes." J Exp Med **184**(2): 569-77.
- Loetscher, P., Uguccioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. und Dayer, J. M. (1998). "CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes." Nature **391**(6665): 344-5.
- Luckow, B., Joergensen, J., Chilla, S., Li, J. P., Henger, A., Kiss, E., Wiczorek, G., Roth, L., Hartmann, N., Hoffmann, R., Kretzler, M., Nelson, P. J., Perez de Lema, G., Maier, H., Wurst, W., Balling, R., Pfeffer, K., Grone, H. J., Schlöndorff, D. und Zerwes, H. G. (2004). "Reduced intragraft mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp3, Mmp12, Mmp13 and Adam8, and diminished transplant arteriosclerosis in Ccr5-deficient mice." Eur J Immunol **34**(9): 2568-78.
- Luckow, B., Schlöndorff, D., Wolf, G., (1995). "The Monocyte Chemoattractant Protein 1." In Molecular Nephrology: Kidney Function in Health and Disease, Schlöndorff, D. und Bonventre, J. Marcel Dekker: 653-671.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation." N Engl J Med **338**(7): 436-45.
- Luster, A. D., Unkeless, J. C. und Ravetch, J. V. (1985). "Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins." Nature **315**(6021): 672-6.
- Luther, S. A. und Cyster, J. G. (2001). "Chemokines as regulators of T cell differentiation." Nat Immunol **2**(2): 102-7.
- Machado, F. S., Koyama, N. S., Carregaro, V., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M., Teixeira, M. M., Rossi, M. A. und Silva, J. S. (2005). "CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*." J Infect Dis **191**(4): 627-36.
- Mack, M., Brühl, H., Gruber, R., Jaeger, C., Cihak, J., Eiter, V., Plachy, J., Stangassinger, M., Uhlig, K., Schattenkirchner, M. und Schlöndorff, D. (1999). "Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis." Arthritis & Rheumatis **42**(5): 981-988.
- Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A. E., Plachy, J., Brühl, H., Frink, M., Anders, H. J., Vielhauer, V., Pflister, J., Stangassinger, M. und Schlöndorff, D. (2001). "Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice." J Immunol **166**(7): 4697-704.
- Mack, M., Luckow, B., Nelson, P. J., Cihak, J., Simmons, G., Clapham, P. R., Signorel, N., Marsh, M., Stangassinger, M., Borlat, F., Wells, T. N., Schlöndorff, D. und Proudfoot, A. E. (1998). "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity." J Exp Med **187**(8): 1215-24.
- Mack, M. und Schlöndorff, D. (2000). "Downmodulation and recycling of chemokine receptors." Methods Mol Biol **138**: 191-5.

- Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.
- Mackay, C. R. (2008). "Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies." Nat Immunol **9**(9): 988-98.
- Maghazachi, A. A. (1999). "Intracellular signalling pathways induced by chemokines in natural killer cells." Cell Signal **11**(6): 385-90.
- Maghazachi, A. A. (2000). "Intracellular signaling events at the leading edge of migrating cells." Int J Biochem Cell Biol **32**(9): 931-43.
- Maho, A., Bensimon, A., Vassart, G. und Parmentier, M. (1999). "Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome." Cytogenet Cell Genet **87**(3-4): 265-8.
- Martin, K., Heinzlmann, M., Borchers, R., Mack, M., Loeschke, K. und Folwaczny, C. (2001). "Delta32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene in inflammatory bowel disease." Clin Immunol **98**(1): 18-22.
- Martinson, J. J., Chapman, N. H., Rees, D. C., Liu, Y. T. und Clegg, J. B. (1997). "Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion." Nat Genet **16**(1): 100-3.
- Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H. F., Leonard, E. J. und Oppenheim, J. J. (1988). "Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor." J Exp Med **167**(6): 1883-93.
- Maus, U., von Grote, K., Kuziel, W. A., Mack, M., Miller, E. J., Cihak, J., Stangassinger, M., Maus, R., Schlöndorff, D., Seeger, W. und Lohmeyer, J. (2002). "The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice." Am J Respir Crit Care Med **166**(3): 268-73.
- Maus, U. A., Wellmann, S., Hampl, C., Kuziel, W. A., Srivastava, M., Mack, M., Everhart, M. B., Blackwell, T. S., Christman, J. W., Schlöndorff, D., Bohle, R. M., Seeger, W. und Lohmeyer, J. (2005). "CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(2): L350-8.
- McDyer, J. F., Dybul, M., Goletz, T. J., Kinter, A. L., Thomas, E. K., Berzofsky, J. A., Fauci, A. S. und Seder, R. A. (1999). "Differential effects of CD40 ligand/trimer stimulation on the ability of dendritic cells to replicate and transmit HIV infection: evidence for CC-chemokine-dependent and -independent mechanisms." J Immunol **162**(6): 3711-3717.
- McManus, C., Berman, J. W., Brett, F. M., Staunton, H., Farrell, M. und Brosnan, C. F. (1998). "MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study." J Neuroimmunol **86**(1): 20-29.
- Mecas, J., Franklin, G., Kuziel, W. A., Brubaker, R. R., Falkow, S. und Mosier, D. E. (2004). "Evolutionary genetics: CCR5 mutation and plague protection." Nature **427**(6975): 606.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Fernandez, S., Martin, d. A., Jones, D. R., Toran, J. L. und Martinez, A. (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." EMBO J **20**(10): 2497-2507.
- Mellado, M., Vila-Coro, A. J., Martinez, C. und Rodriguez-Frade, J. M. (2001). "Receptor dimerization: a key step in chemokine signaling." Cell Mol Biol **47**(4): 575-82.
- Mestas, J. und Hughes, C. C. (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-8.
- Metchnikoff, I. (1891). "Lectures on Phagocytosis and Immunity." Brit Med J **1**: 213-217.



- Meyer, A., Coyle, A. J., Proudfoot, A. E., Wells, T. N. und Power, C. A. (1996). "Cloning and characterization of a novel murine macrophage inflammatory protein-1 alpha receptor." J Biol Chem **271**(24): 14445-51.
- Michael, N. L., Chang, G., Louie, L. G., Mascola, J. R., Dondero, D., Birx, D. L. und Sheppard, H. W. (1997). "The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **3**(3): 338-40.
- Michael, N. L., Louie, L. G., Rohrbaugh, A. L., Schultz, K. A., Dayhoff, D. E., Wang, C. E. und Sheppard, H. W. (1997). "The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression." Nat Med **3**(10): 1160-2.
- Miller, M. D. und Krangel, M. S. (1992). "Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines." Crit Rev Immunol **12**(1-2): 17-46.
- Mizel, S. B. und Farrar, J. J. (1979). "Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors." Cell Immunol **48**(2): 433-6.
- Moore, B. B., Kolodsick, J. E., Thannickal, V. J., Cooke, K., Moore, T. A., Hogaboam, C., Wilke, C. A. und Toews, G. B. (2005). "CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury." Am J Pathol **166**(3): 675-84.
- Moore, B. B., Paine, R., III, Christensen, P. J., Moore, T. A., Sitterding, S., Ngan, R., Wilke, C. A., Kuziel, W. A. und Toews, G. B. (2001). "Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling." J Immunol **167**(8): 4368-4377.
- Moore, U. M., Kaplow, J. M., Pleass, R. D., Castro, S. W., Naik, K., Lynch, C. N., Daly, S., Roach, A. G., Jaye, M. und Williams, R. J. (1997). "Monocyte chemoattractant protein-2 is a potent agonist of CCR2B." J Leukoc Biol **62**(6): 911-915.
- Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W. und Fauci, A. S. (1998). "Exposure to bacterial products renders macrophages highly susceptible to T-tropic HIV-1." J Clin Invest **102**(8): 1540-1550.
- Mueller, A., Kelly, E. und Strange, P. G. (2002a). "Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5." Blood **99**(3): 785-91.
- Mueller, A., Mahmoud, N. G., Goedecke, M. C., McKeating, J. A. und Strange, P. G. (2002b). "Pharmacological characterization of the chemokine receptor, CCR5." Br J Pharmacol **135**(4): 1033-43.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Mummidi, S., Ahuja, S. S., McDaniel, B. L. und Ahuja, S. K. (1997). "The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons." J Biol Chem **272**(49): 30662-71.
- Murdoch, C. und Finn, A. (2000). "Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases." Blood **95**(10): 3032-43.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J. und Power, C. A. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.
- Murphy, P. M. und Tiffany, H. L. (1991). "Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor." Science **253**(5025): 1280-3.
- Nanki, T., Nagasaka, K., Hayashida, K., Saita, Y. und Miyasaka, N. (2001). "Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis." J Immunol **167**(9): 5381-5385.

- Nansen, A., Christensen, J. P., Andreasen, S. S., Bartholdy, C., Christensen, J. E. und Thomsen, A. R. (2002). "The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity." Blood **99**(4): 1237-1245.
- Nelson, P. J., Ortiz, B. D., Pattison, J. M. und Krensky, A. M. (1996). "Identification of a novel regulatory region critical for expression of the RANTES chemokine in activated T lymphocytes." J Immunol **157**(3): 1139-1148.
- Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J. Y., Horuk, R. und Schall, T. J. (1993). "Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor." Cell **72**(3): 415-25.
- Nibbs, R. J., Wylie, S. M., Pragnell, I. B. und Graham, G. J. (1997). "Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5." J Biol Chem **272**(19): 12495-504.
- Nieto, M., Navarro, F., Perez-Villar, J. J., del Pozo, M. A., Gonzalez-Amaro, R., Mellado, M., Frade, J. M., Martinez, A. C., Lopez-Botet, M. und Sanchez-Madrid, F. (1998). "Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions." J Immunol **161**(7): 3330-9.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990). "A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells." Nucleic Acids Res **18**(20): 6169.
- Nomiyama, H., Fukuda, S., Iio, M., Tanase, S., Miura, R. und Yoshie, O. (1999). "Organization of the chemokine gene cluster on human chromosome 17q11.2 containing the genes for CC chemokine MPIF-1, HCC-2, HCC-1, LEC, and RANTES." J Interferon Cytokine Res **19**(3): 227-234.
- Nomiyama, H., Hieshima, K., Nakayama, T., Sakaguchi, T., Fujisawa, R., Tanase, S., Nishiura, H., Matsuno, K., Takamori, H., Tabira, Y., Yamamoto, T., Miura, R. und Yoshie, O. (2001). "Human CC chemokine liver-expressed chemokine/CCL16 is a functional ligand for CCR1, CCR2 and CCR5, and constitutively expressed by hepatocytes." Int Immunol **13**(8): 1021-1029.
- Obaru, K., Fukuda, M., Maeda, S. und Shimada, K. (1986). "A cDNA clone used to study mRNA inducible in human tonsillar lymphocytes by a tumor promoter." J Biochem (Tokyo) **99**(3): 885-94.
- Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. und Uguccioni, M. (2001). "Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5." Blood **97**(7): 1920-4.
- Ohmori, Y., Schreiber, R. D. und Hamilton, T. A. (1997). "Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB." J Biol Chem, **272**(23): 14899-14907.
- Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O., Mukaida, N. und Matsushima, K. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." Annu Rev Immunol **9**: 617-48.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.
- Patterson, B. K., Czerniewski, M., Andersson, J., Sullivan, Y., Su, F., Jiyamapa, D., Burki, Z. und Landay, A. (1999). "Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes." Clin Immunol **91**(3): 254-262.
- Pattison, J., Nelson, P. J., Huie, P., von, L. I., Farshid, G., Sibley, R. K. und Krensky, A. M. (1994). "RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney." Lancet **343**(8891): 209-211.
- Pelletier, J. und Sonenberg, N. (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." Nature **334**(6180): 320-5.
- Penton-Rol, G., Cota, M., Polentarutti, N., Luini, W., Bernasconi, S., Borsatti, A., Sica, A., LaRosa, G. J., Sozzani, S., Poli, G. und Mantovani, A. (1999). "Up-regulation of CCR2 chemokine receptor

- expression and increased susceptibility to the multitropic HIV strain 89.6 in monocytes exposed to glucocorticoid hormones." J Immunol **163**(6): 3524-9.
- Penton-Rol, G., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Mancinelli, R., Sica, A., Sozzani, S. und Mantovani, A. (1998). "Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma." J Immunol **160**(8): 3869-73.
- Perez de Lema, G., Maier, H., Nieto, E., Vielhauer, V., Luckow, B., Mampaso, F. und Schlöndorff, D. (2001). "Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis." J Am Soc Nephrol **12**(7): 1369-82.
- Perez de Lema, G., Maier, H., Franz, T. J., Escribese, M., Chilla, S., Segerer, S., Camarasa, N., Schmid, H., Banas, B., Kalaydjiev, S., Busch, D. H., Pfeffer, K., Mampaso, F., Schlöndorff, D. und Luckow, B. (2005). "Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice." J Am Soc Nephrol **16**(12): 3592-601.
- Peters, W., Dupuis, M. und Charo, I. F. (2000). "A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses." J Immunol **165**(12): 7072-7077.
- Peters, W., Scott, H. M., Chambers, H. F., Flynn, J. L., Charo, I. F. und Ernst, J. (2001). "Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis." Proc Natl Acad Sci USA **98**(14): 7958-63.
- Peters, W., Cyster, J., Mack, M., Schlöndorff, D., Wolf, A., Ernst, J. und Charo, I. F. (2004). "CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **172**(12): 7647-53.
- Polentarutti, N., Allavena, P., Bianchi, G., Giardina, G., Basile, A., Sozzani, S., Mantovani, A. und Introna, M. (1997). "IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences." J Immunol **158**(6): 2689-94.
- Premack, B. A. und Schall, T. J. (1996). "Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection." Nat Med **2**(11): 1174-8.
- Price, D. A., Klenerman, P., Booth, B. L., Phillips, R. E. und Sewell, A. K. (1999). "Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity." Immunol Today **20**(5): 212-216.
- Proffitt, J., Crabtree, G., Grove, M., Daubersies, P., Bailleul, B., Wright, E. und Plumb, M. (1995). "An ATF/CREB-binding site is essential for cell-specific and inducible transcription of the murine MIP-1 beta cytokine gene." Gene **152**(2): 173-179.
- Proudfoot, A. E., Power, C. A., Hoogewerf, A., Montjovent, M. O., Borlat, F. und Wells, T. N. (1995). "Characterisation of the RANTES/MIP-1 alpha receptor (CC CKR-1) stably transfected in HEK-293 cells and the recombinant ligands." FEBS Lett. **376**(1-2): 19-23.
- Proudfoot, A. E., Power, C. A., Hoogewerf, A. J., Montjovent, M. O., Borlat, F., Offord, R. E. und Wells, T. N. (1996). "Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist." J Biol Chem **271**(5): 2599-2603.
- Proudfoot, A. E., Handel T. M., Johnson Z. et al (2003). "Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines." Proc Natl Acad Sci USA **100**: 1885-1890.
- Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B. und Mackay, C. R. (1998). "The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions." J Clin Invest **101**(4): 746-54.

- Quillent, C., Oberlin, E., Braun, J., Rousset, D., Gonzalez-Canali, G., Metais, P., Montagnier, L., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. und Beretta, A. (1998). "HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene." Lancet **351**(9095): 14-8.
- Quinones, M. P., Ahuja, S. K., Jimenez, F., Schaefer, J., Garavito, E., Rao, A., Chenuaux, G., Reddick, R. L., Kuziel, W. A. und Ahuja, S. S. (2004). "Experimental arthritis in CC chemokine receptor 2-null mice closely mimics severe human rheumatoid arthritis." J Clin Invest **113**(6): 856-66.
- Quinones, M. P., Estrada, C. A., Kalkonde, Y., Ahuja, S. K., Kuziel, W. A., Mack, M. und Ahuja, S. S. (2005). "The complex role of the chemokine receptor CCR2 in collagen-induced arthritis: implications for therapeutic targeting of CCR2 in rheumatoid arthritis." J Mol Med **83**(9): 672-81.
- Quinones, M. P., Jimenez, F., Martinez, H., Estrada, C. A., Willmon, O., Dudley, M., Kuziel, W. A., Melby, P. C., Reddick, R. L., Ahuja, S. K. und Ahuja, S. S. (2006). "CC chemokine receptor (CCR)-2 prevents arthritis development following infection by *Mycobacterium avium*." J Mol Med **84**(6): 503-12.
- Rabin, R. L., Park, M. K., Liao, F., Swofford, R., Stephany, D. und Farber, J. M. (1999). "Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling." J Immunol **162**(7): 3840-50.
- Radloff, R., Bauer, W. und Vinograd, J. (1967). "A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells." Proc Natl Acad Sci USA **57**(5): 1514-21.
- Ransohoff, R. M., Tani, M., Glabinski, A. R., Chernosky, A., Krivacic, K., Peterson, J. W., Chien, H. F. und Trapp, B. D. (1997). "Chemokines und chemokine receptors in model neurological pathologies: molecular and immunocytochemical approaches." Methods Enzymol **287**: 319-348.
- Raport, C. J., Gosling, J., Schweickart, V. L., Gray, P. W. und Charo, I. F. (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." J Biol Chem **271**(29): 17161-6.
- Ritter, L. M., Bryans, M., Abdo, O., Sharma, V. und Wilkie, N. M. (1995). "MIP1 alpha nuclear protein (MNP), a novel transcription factor expressed in hematopoietic cells that is crucial for transcription of the human MIP-1 alpha gene." Mol Cell Biol **15**(6): 3110-3118.
- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. und Sodroski, J. (1998). "A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding." Science **280**(5371): 1949-53.
- Robertson, H., Wheeler, J., Morley, A. R., Booth, T. A., Talbot, D. und Kirby, J. A. (1998). "Beta-chemokine expression and distribution in paraffin-embedded transplant renal biopsy sections: analysis by scanning laser confocal microscopy." Histochem Cell Biol **110**(2): 207-213.
- Robinson, E., Keystone, E. C., Schall, T. J., Gillett, N. und Fish, E. N. (1995). "Chemokine expression in rheumatoid arthritis (RA): evidence of RANTES and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta production by synovial T cells." Clin Exp Immunol **101**(3): 398-407.
- Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., Martinez-A, C. und Oppenheim, J. J. (2001). "CCR2." In Cytokine Reference, Academic Press: 2041-2053.
- Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., de Ana, A. M., Albar, J. P., Martinez, A. und Mellado, M. (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci USA **96**(7): 3628-3633.
- Roebuck, K. A., Carpenter, L. R., Lakshminarayanan, V., Page, S. M., Moy, J. N. und Thomas, L. L. (1999). "Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB." J Leukoc Biol **65**(3): 291-298.

- Rollins, B. und Oppenheim, J. J. (2001). "MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, and MCP-5." In Cytokine Reference, Academic Press: 1145-1161.
- Rollins, B. J., Morrison, E. D. und Stiles, C. D. (1988). "Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties." Proc Natl Acad Sci USA **85**(11): 3738-42.
- Romano, M., Diomede, L., Sironi, M., Massimiliano, L., Sottocorno, M., Polentarutti, N., Guglielmotti, A., Albani, D., Bruno, A., Fruscella, P., Salmona, M., Vecchi, A., Pinza, M. und Mantovani, A. (2000). "Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins." Lab Invest **80**(7): 1095-1100.
- Rosati, M., Valentin, A., Patenaude, D. J. und Pavlakis, G. N. (2001). "CCAAT-enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) activates CCR5 promoter: increased C/EBP beta and CCR5 in T lymphocytes from HIV-1- infected individuals." J Immunol **167**(3): 1654-1662.
- Ross, T. M., Bieniasz, P. D. und Cullen, B. R. (1998). "Multiple residues contribute to the inability of murine CCR-5 to function as a coreceptor for macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates." J Virol **72**(3): 1918-1924.
- Rubbert, A., Combadiere, C., Ostrowski, M., Arthos, J., Dybul, M., Machado, E., Cohn, M. A., Hoxie, J. A., Murphy, P. M., Fauci, A. S. und Weissman, D. (1998). "Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry." J Immunol **160**(8): 3933-3941.
- Sabeti, P. C., Walsh, E., Schaffner, S. F., Varilly, P., Fry, B., Hutcheson, H. B., Cullen, M., Mikkelsen, T.S., Roy, J., Patterson, N., Cooper, R., Reich, D., Altshuler, D., O'Brien, S. und Lander, E. S. (2005). "The case for selection at CCR5-Delta32." PLoS Biol **3**(11): e378.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. und Mackay, C. R. (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2- mediated responses." Immunol Today **19**(12): 568-74.
- Samanta, A. K., Oppenheim, J. J. und Matsushima, K. (1989). "Identification and characterization of specific receptors for monocyte- derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) on human neutrophils." J Exp Med **169**(3): 1185-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. und Parmentier, M. (1996a). "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." Biochemistry **35**(11): 3362-7.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G. und Parmentier, M. (1996b). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.
- Sandford, A. J., Zhu, S., Bai, T. R., Fitzgerald, J. M. und Pare, P. D. (2001). "The role of the C-C chemokine receptor-5 Delta32 polymorphism in asthma and in the production of regulated on activation, normal T cells expressed and secreted." J Allergy Clin Immunol **108**(1): 69-73.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci USA **74**(12): 5463-7.
- Sato, N., Ahuja, S. K., Quinones, M., KostECKI, V., Reddick, R. L., Melby, P. C., Kuziel, W. A. und Ahuja, S. S. (2000). "CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-

- resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation." *J Exp Med* **192**(2): 205-218.
- Sato, N., Kuziel, W. A., Melby, P. C., Reddick, R. L., KostECKI, V., Zhao, W., Maeda, N., Ahuja, S. K. und Ahuja, S. S. (1999). "Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice." *J Immunol* **163**(10): 5519-5525.
- Satriano, J. A., Shuldiner, M., Hora, K., Xing, Y., Shan, Z. und Schlöndorff, D. (1993). "Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase." *J Clin Invest* **92**(3): 1564-71.
- Schall, T., Bacon, K. und Krensky, A. (1995). "RANTES Receptors: Diversity in Structure and Function." In *Biology of the Chemokine RANTES*. Austin, Texas, R.G. Landes Company: 69-86.
- Schall, T. J. (1991). "Biology of the RANTES/SIS cytokine family." *Cytokine* **3**(3): 165-83.
- Schall, T. J., Greaves, D. R. und Oppenheim, J. J. (2001). "RANTES." In *Cytokine Reference*, Academic Press: 1161-1166.
- Schall, T. J., Jongstra, J., Dyer, B. J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M. M. und Krensky, A. M. (1988). "A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family." *J Immunol* **141**(3): 1018-25.
- Schall, T., Simpson, N. und Mak, J. (1992). "Molecular cloning and expression of the murine RANTES cytokine: structural and functional conservation between mouse and man." *Eur J Immunol* **22**(6): 1477-1481.
- Schechter, A. D., Calderon, T. M., Berman, A. B., McManus, C. M., Fallon, J. T., Rossikhina, M., Zhao, W., Christ, G., Berman, J. W. und Taubman, M. B. (2000). "Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5." *J Biol Chem* **275**(8): 5466-5471.
- Schiffmann, E., Corcoran, B. A. und Wahl, S. M. (1975). "N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes." *Proc Natl Acad Sci USA* **72**(3): 1059-62.
- Schimke, R. T. (1984). "Gene amplification in cultured animal cells." *Cell* **37**(3): 705-13.
- Schlöndorff, D., Nelson, P. J., Luckow, B. und Banas, B. (1997). "Chemokines and renal disease." *Kidney Int* **51**(3): 610-21.
- Schneider, M. A., Brühl, H., Wechselberger, A., Cihak, J., Stangassinger, M., Schlöndorff, D. und Mack, M. (2005). "In vitro and in vivo properties of a dimeric bispecific single-chain antibody IgG-fusion protein for depletion of CCR2+ target cells in mice." *Eur J Immunol* **35**(3): 987-95.
- Schroeder, J. M., Mrowietz, U., Morita, E. und Christophers, E. (1987). "Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity." *J Immunol* **139**(10): 3474-83.
- Schuh, J. M., Blease, K. und Hogaboam, C. M. (2002). "The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) and RANTES/CCL5 during chronic fungal asthma in mice." *FASEB J*, **16**(2): 228-230.
- Seegerer, S., Cui, Y., Eitner, F., Goodpaster, T., Hudkins, K. L., Mack, M., Cartron, J. P., Colin, Y., Schlöndorff, D. und Alpers, C. E. (2001). "Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection." *Am J Kidney Dis* **37**(3): 518-531.
- Seegerer, S., Cui, Y., Hudkins, K. L., Goodpaster, T., Eitner, F., Mack, M., Schlöndorff, D. und Alpers, C. E. (2000). "Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis." *J Am Soc Nephrol* **11**(12): 2231-42.

- Seifarth, C., Mack, M., Steinlicht, S., Hahn, E. G. und Lohmann, T. (2006). "Transient chemokine receptor blockade does not prevent, but may accelerate type 1 diabetes in prediabetic NOD mice." Horm Metab Res **38**(3): 167-71.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M. und Pamer, E. G. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." Annu Rev Immunol **26**: 421-52.
- Sherry, B., Espinoza, M., Manogue, K. R. und Cerami, A. (1998). "Induction of the chemokine beta peptides, MIP-1 alpha and MIP-1 beta, by lipopolysaccharide is differentially regulated by immunomodulatory cytokines gamma-IFN, IL-10, IL-4, and TGF-beta." Mol Med **4**(10): 648-657.
- Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., Davatelis, G., Wolpe, S. D., Masiarz, F., Coit, D. und Cerami, A. (1988). "Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta." J Exp Med **168**(6): 2251-2259.
- Sica, A., Saccani, A., Borsatti, A., Power, C. A., Wells, T. N., Luini, W., Polentarutti, N., Sozzani, S. und Mantovani, A. (1997). "Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes." J Exp Med **185**(5): 969-974.
- Signoret, N., Pelchen-Matthews, A., Mack, M., Proudfoot, A. E. und Marsh, M. (2000). "Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5." J Cell Biol **151**(6): 1281-94.
- Signoret, N., Hewlett, L., Wavre, S., Pelchen-Matthews, A., Oppermann, M. und Marsh, M. (2005). "Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 is clathrin dependent." Mol Biol Cell **16**(2): 902-17.
- Simmons, G., Clapham, P. R., Picard, L., Offord, R. E., Rosenkilde, M. M., Schwartz, T. W., Buser, R., Wells, T. N. und Proudfoot, A. E. (1997). "Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist." Science **276**(5310): 276-279.
- Slattery, D. M., Gerard, N. und Gerard, C. (2000). "Gene targeting of chemokines and their receptors." Springer Semin Immunopathol **22**(4): 417-32.
- Smith, J. B. und Herschman, H. R. (1995). "Glucocorticoid-attenuated response genes encode intercellular mediators, including a new C-X-C chemokine." J Biol Chem **270**(28): 16756-16765.
- Smith, M. W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Lomb, D. A., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Kaslow, R., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Vlahov, D., Hoots, K., Hilgartner, M. W. und O'Brien, S. J. (1997). "Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression." Science **277**(5328): 959-965.
- Snyderman, R. und Pike, M. C. (1984). "Chemoattractant receptors on phagocytic cells." Annu Rev Immunol **2**: 257-81.
- Snyderman, R., Shin, H., Phillips, J., Gewurz, H. und Mergenhagen, S. (1969). "A neutrophil chemotactic factor derived from C5 upon interaction of guinea pig serum with endotoxin." J Immunol **103**(3): 413-22.
- Song, A., Chen, Y. F., Thamtrakoln, K., Storm, T. und Krensky, A. (1999). "RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes." Immunity **10**(1): 93-103.
- Song, A., Nikolcheva, T. und Krensky, A. M. (2000). "Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes." Immunol Rev **177**: 236-45.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataru, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R. und Mantovani, A. (1998). "Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties." J Immunol **161**(3): 1083-1086.

- Sozzani, S., Ghezzi, S., Iannolo, G., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Sica, A., Locati, M., Mackay, C., Wells, T. N., Biswas, P., Vicenzi, E., Poli, G. und Mantovani, A. (1998). "Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes." J Exp Med **187**(3): 439-444.
- Sozzani, S., Introna, M., Bernasconi, S., Polentarutti, N., Cinque, P., Poli, G., Sica, A. und Mantovani, A. (1997). "MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression." J Leukoc Biol **62**(1): 30-3.
- Sozzani, S., Luini, W., Bianchi, G., Allavena, P., Wells, T. N., Napolitano, M., Bernardini, G., Vecchi, A., D'Ambrosio, D., Mazzeo, D., Sinigaglia, F., Santoni, A., Maggi, E., Romagnani, S. und Mantovani, A. (1998). "The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant." Blood **92**(11): 4036-4039.
- Sozzani, S., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Zhou, D., Piemonti, L., D'Amico, G., Power, C. A., Wells, T. N., Gobbi, M., Allavena, P. und Mantovani, A. (1997). "Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines." J Immunol **159**(4): 1993-2000.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**(2): 301-14.
- Stephens, J. C., Reich, D. E., Goldstein, D. B., Shin, H. D., Smith, M. W., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Allikmets, R., Schriml, L., Gerrard, B., Malasky, M., Ramos, M. D., Morlot, S., Tzietis, M., Oddoux, C., di Giovine, F. S., Nasioulas, G., Chandler, D., Aseev, M., Hanson, M., Kalaydjieva, L., Glavac, D., Gasparini, P. und Dean, M. (1998). "Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes." Am J Hum Genet **62**(6): 1507-1515.
- Stewart, G. J., Ashton, L. J., Biti, R. A., French, R. A., Bennetts, B. H., Newcombe, N. R., Benson, E. M., Carr, A., Cooper, D. A. und Kaldor, J. M. (1997). "Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection." AIDS **11**(15): 1833-1838.
- Stoeckle, M. Y. und Barker, K. A. (1990). "Two burgeoning families of platelet factor 4-related proteins: mediators of the inflammatory response." New Biol **2**(4): 313-23.
- Strieter, R. M., Standiford, T. J., Huffnagle, G. B., Colletti, L. M., Lukacs, N. W. und Kunkel, S. L. (1996). ""The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease." J Immunol **156**(10): 3583-6.
- Szalai, C., Csaszar, A., Czinner, A., Szabo, T., Panczel, P., Madacsy, L. und Falus, A. (1999). "Chemokine receptor CCR2 and CCR5 polymorphisms in children with insulin-dependent diabetes mellitus." Pediatr Res **46**(1): 82-84.
- Tanaka, S., Green, S. R. und Quehenberger, O. (2002). "Differential Expression of the Isoforms for the Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor, CCR2, in Monocytes." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 73-80.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. und Shaw, S. (1993). "T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta." Nature **361**(6407): 79-82.
- Taub, D. D. und Oppenheim, J. J. (1993). "Review of the chemokine meeting the Third International Symposium of Chemotactic Cytokines." Cytokine **5**(3): 175-9.
- Tesch, G. H., Schwarting, A., Kinoshita, K., Lan, H. Y., Rollins, B. J. und Kelley, V. R. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis." J Clin Invest **103**(1): 73-80.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nat Immunol **2**(2): 129-34.
- Thelen, M. und Baggiolini, M. (2001). "Is dimerization of chemokine receptors functionally relevant?" Sci STKE **2001**(104): E34.



- Thelen, M. and Stein, J. V. (2008). "How chemokines invite leukocytes to dance." Nat Immunol **9**(9): 953-9.
- Thirion, S., Nys, G., Fiten, P., Masure, S., van Damme, J. und Opdenakker, G. (1994). "Mouse macrophage derived monocyte chemotactic protein-3: cDNA cloning and identification as MARC/FIC." Biochem Biophys Res Commun **201**(2): 493-499.
- Thomson, A. (1994). The Cytokine Handbook. London, Academic Press Limited.
- Tran, E. H., Kuziel, W. A. und Owens, T. (2000). "Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient in either the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha or its CCR5 receptor." Eur J Immunol **30**(5): 1410-1415.
- Traynor, T. R., Kuziel, W. A., Toews, G. B. und Huffnagle, G. B. (2000). "CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection." J Immunol **164**(4): 2021-2027.
- Tuttle, D. L., Harrison, J. K., Anders, C., Sleasman, J. W. und Goodenow, M. M. (1998). "Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(6): 4962-4969.
- Tyner, J. W., Uchida, O., Kajiwara, N., Kim, E. Y., Patel, A. C., O'Sullivan, M. P., Walter, M. J., Schwendener, R. A., Cook, D. N., Danoff, T. M. und Holtzman, M. J. (2005). "CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection." Nat Med **11**(11): 1180-7.
- Ueda, A., Okuda, K., Ohno, S., Shirai, A., Igarashi, T., Matsunaga, K., Fukushima, J., Kawamoto, S., Ishigatsubo, Y. und Okubo, T. (1994). "NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene." J Immunol **153**(5): 2052-63.
- Ugucioni, M., Mackay, C. R., Ochensberger, B., Loetscher, P., Rhis, S., LaRosa, G. J., Rao, P., Ponath, P. D., Baggiolini, M. und Dahinden, C. A. (1997). "High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines." J Clin Invest **100**(5): 1137-1143.
- Urlaub, G. und Chasin, L. A. (1980). "Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity." Proc Natl Acad Sci USA **77**(7): 4216-20.
- van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J. P. und Opdenakker, G. (1992). "Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family." J Exp Med **176**(1): 59-65.
- van Otteren, G. M., Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Danforth, J. M., Burdick, M. D., Abruzzo, L. V. und Strieter, R. M. (1994). "Expression and regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha by murine alveolar and peritoneal macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **10**(1): 8-15.
- Vecchi, A., Massimiliano, L., Ramponi, S., Luini, W., Bernasconi, S., Bonecchi, R., Allavena, P., Parmentier, M., Mantovani, A. und Sozzani, S. (1999). "Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells." J Leukoc Biol **66**(3): 489-494.
- Vielhauer, V., Anders, H. J., Perez de Lema, G., Luckow, B., Schlöndorff, D. und Mack, M. (2003). "Phenotyping renal leukocyte subsets by four-color flow cytometry: characterization of chemokine receptor expression." Nephron Exp Nephrol **93**(2): e63.
- Vila-Coro, A., Mellado, M., Martin de Ana, A., Martinez, A. und Rodriguez-Frade, J. (1999). "Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex." J Immunol **163**(6): 3037-44.
- von Andrian, U. H. und Mackay, C. R. (2000). "T-cell function and migration. Two sides of the same coin." N Engl J Med **343**(14): 1020-34.

- Wada, T., Yokoyama, H., Matsushima, K. und Kobayashi, K. (2001). "Chemokines in renal diseases." Int Immunopharmacol **1**(4): 637-645.
- Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S. und Luster, A. D. (1998). "Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans." Nature **391**(6670): 908-911.
- Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P. und Levy, J. A. (1986). "CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication." Science **234**(4783): 1563-1566.
- Waller, A. (1846). "Microscopical observations on the perforation of the capillaries by the corpuscles of the blood, and on the origin of mucous and pus-globules." Philos Magazine **29**: 397.
- Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H. und Baggiolini, M. (1987). "Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes." Biochem Biophys Res Commun **149**(2): 755-61.
- Wang, G. und O, K. (2001). "Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals." Biochem J **357**(Pt 1): 233-240.
- Wang, J., Roderiquez, G., Oravec, T. und Norcross, M. A. (1998). "Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression." J Virol **72**(9): 7642-7647.
- Wang, J. M., Sherry, B., Fivash, M. J., Kelvin, D. J. und Oppenheim, J. J. (1993). "Human recombinant macrophage inflammatory protein-1 alpha and -beta and monocyte chemoattractant and activating factor utilize common and unique receptors on human monocytes." J Immunol **150**(7): 3022-9.
- Wareing, M. D., Lyon, A., Inglis, C., Giannoni, F., Charo, I. and Sarawar, S. R. (2007). "Chemokine regulation of the inflammatory response to a low-dose influenza infection in CCR2<sup>-/-</sup> mice." J Leukoc Biol **81**(3): 793-801.
- Weber, K. S., Gröne, H. J., Röcken, M., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Proudfoot, A. E., Nelson, P. J. und Weber, C. (2001). "Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II." Eur J Immunol **31**(8): 2458-66.
- Weber, K. S., Nelson, P. J., Gröne, H. J. und Weber, C. (1999). "Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(9): 2085-2093.
- Wells, T. N., Power, C. A., Shaw, J. P. und Proudfoot, A. E. (2006). "Chemokine blockers - therapeutics in the making?" Trends Pharmacol Sci **27**(1): 41-7.
- Wilcox, J. N., Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Gordon, D. und Schall, T. J. (1994). "Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques." J Atheroscler Thromb **1 Suppl 1**: S10-S13.
- Winter, C., Taut, K., Srivastava, M., Langer, F., Mack, M., Briles, D. E., Paton, J. C., Maus, R., Welte, T., Gunn, M. D. und Maus, U. A. (2007). "Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to Streptococcus pneumoniae infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis." J Immunol **178**(9): 5828-38.
- Wolf, G., Haberstroh, U. und Neilson, E. G. (1992). "Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells." Am J Pathol **140**(1): 95-107.
- Wolpe, S. D. und Cerami, A. (1989). "Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines." FASEB J **3**(14): 2565-2573.

- Wolpe, S. D., Sherry, B., Juers, D., Davatelis, G., Yurt, R. W. und Cerami, A. (1989). "Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2." Proc Natl Acad Sci USA **86**(2): 612-616.
- Wong, L. M., Myers, S. J., Tsou, C. L., Gosling, J., Arai, H. und Charo, I. F. (1997). "Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking." J Biol Chem **272**(2): 1038-45.
- Wu, L., LaRosa, G., Kassam, N., Gordon, C. J., Heath, H., Ruffing, N., Chen, H., Humblias, J., Samson, M., Parmentier, M., Moore, J. P. und Mackay, C. R. (1997a). "Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding." J Exp Med **186**(8): 1373-1381.
- Wu, L., Paxton, W. A., Kassam, N., Ruffing, N., Rottman, J. B., Sullivan, N., Choe, H., Sodroski, J., Newman, W., Koup, R. A. und Mackay, C. R. (1997b). "CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro." J Exp Med **185**(9): 1681-91.
- Yamagami, S., Tokuda, Y., Ishii, K., Tanaka, H. und Endo, N. (1994). "cDNA cloning and functional expression of a human monocyte chemoattractant protein 1 receptor." Biochem Biophys Res Commun **202**(2): 1156-62.
- Yang, Y. F., Tomura, M., Iwasaki, M., Mukai, T., Gao, P., Ono, S., Zou, J. P., Shearer, G. M., Fujiwara, H. und Hamaoka, T. (2001). "IL-12 as well as IL-2 upregulates CCR5 expression on T cell receptor- triggered human CD4+ and CD8+ T cells." J Clin Immunol **21**(2): 116-125.
- Yasumoto, K., Okamoto, S., Mukaida, N., Murakami, S., Mai, M. und Matsushima, K. (1992). "Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene." J Biol Chem **267**(31): 22506-22511.
- Yoneyama, H., Kawasaki, S. und Matsushima, K. (2000). "Regulation of Th1 and Th2 immune responses by chemokines." Springer Semin Immunopathol **22**(4): 329-44.
- Yoshie, O. (2000). "Role of chemokines in trafficking of lymphocytes and dendritic cells." Int J Hematol **72**(4): 399-407.
- Yoshie, O., Imai, T. und Nomiya, H. (2001). "Chemokines in immunity." Adv Immunol **78**: 57-110.
- Yoshimura, T. und Leonard, E. J. (1990). "Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes." J Immunol **145**(1): 292-7.
- Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J. J. und Leonard, E. J. (1987). "Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)- stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1)." J Immunol **139**(3): 788-93.
- Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S. K., Appella, E., Lerman, M. I. und Leonard, E. J. (1989). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE." FEBS Lett **244**(2): 487-93.
- Zaballos, A., Gutierrez, J., Varona, R., Ardavin, C. und Marquez, G. (1999). "Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK." J Immunol **162**(10): 5671-5.
- Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C. K., Klaus-Kovtun, V., Mostowski, H., Manischewitz, J. und Golding, H. (1997). "Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection." Nat Med **3**(12): 1369-1375.
- Zapico, I., Coto, E., Rodriguez, A., Alvarez, C., Torre, J. C. und Alvarez, V. (2000). "CCR5 DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis." Genes Immun **1**(4): 288-289.

- Zhong, M., Kuziel, W. A., Pamer, E. und Serbina, N. (2004). "Chemokine receptor 5 is dispensable for innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes* infection." Infect Immun **72**(2): 1057-64.
- Zhou, Y., Kurihara, T., Ryseck, R. P., Yang, Y., Ryan, C., Loy, J., Warr, G. und Bravo, R. (1998). "Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor." J Immunol **160**(8): 4018-4025.
- Zhou, Y., Yang, Y., Warr, G. und Bravo, R. (1999). "LPS down-regulates the expression of chemokine receptor CCR2 in mice and abolishes macrophage infiltration in acute inflammation." J Leukoc Biol **65**(2):265-9.
- Zigmond, S. H. und Hirsch, J. G. (1973). "Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor." J Exp Med **137**(2): 387-410.
- Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., Santoni, A., Zlotnik, A. und Napolitano, M. (1998). "The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells." J Immunol **161**(2): 547-51.
- Zlotnik, A. und Yoshie, O. (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.
- Zlotnik, A., Yoshie, O. und Nomiyama, H. (2006). "The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution." Genome Biol **7**(12): 243.
- Zou, W., Foussat, A., Houhou, S., Durand-Gassel, I., Dulioust, A., Bouchet, L., Galanaud, P., Levy, Y. und Emilie, D. (1999). "Acute upregulation of CCR-5 expression by CD4+ T lymphocytes in HIV- infected patients treated with interleukin-2." AIDS **13**(4): 455-463.

Als Nachschlagewerke für Hintergrundinformationen und als Einführung in die Immunologie, Molekularbiologie und Zellkultur wurden die folgenden Bücher unzählige Male zu Rate gezogen:

- Abbas, A., Lichtman A., Pober J.(2000). Cellular and Molecular Immunology. 4<sup>th</sup> Ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (1994). Molecular Biology of the Cell. 3<sup>rd</sup> Ed., New York, Garland Publishing, Inc.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. New York, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Drlica, K.(1992). Understanding DNA and Gene Cloning - A guide for the curious. 2<sup>nd</sup> Ed., New York, J. Wiley&Sons, Inc.
- Freshney, I. (1994). Culture of Animal Cells: A manual of basic techniques. 2<sup>rd</sup> Ed., New York, J. Wiley & Sons.
- Ibelgauf, H. (1993). Gentechnologie von A bis Z. 1. korrigierter Nachdr., Studienausg., Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2005). Immunobiology - the immune system in health and disease. 6<sup>th</sup> Ed., New York, Garland Science Publishing.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Watson, J., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. (1992). Recombinant DNA. 2nd Ed., New York, W. H. Freeman and Company.

---

## **ANHANG**

## CHEMOKIN AKRONYME, ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

### Chemokin Abkürzungen und Akronyme:

BCA-1	<i>B-Cell Attracting chemokine 1 (CXCL13)</i>
BRAK	<i>Breast and Kindney chemokine (CXCL14)</i>
CTACK	<i>Cutaneous T-cell-Attracting Chemokine (CCL27)</i>
DMC	<i>Dendritic cell and Monocyte Chemokine-like protein (CXCL17)</i>
ELC	<i>Epstein-Barr virus induced gene 1 ligand Chemokine (CCL19)</i>
ENA-78	<i>Epithelial-cell-derived Neutrophil-Activating protein of 78 aminoacids (CXCL5)</i>
GCP-2	<i>Granulocyte Chemotactic Protein (CXCL6)</i>
GRO- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$	<i>Growth related Oncogene <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> (CXCL1-3)</i>
HCC-1,-2,-3	<i>Hemofiltrate CC-Chemokine 1, 2, 3 (CCL14-16)</i>
IL-8	<i>Interleukin-8 (CXCL8)</i>
IP-10	<i>Interferon-<math>\gamma</math>-inducible Protein of 10kDa (CXCL10)</i>
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (CXCL11)</i>
KS-vMIP-II	<i>Kaposi Sarcoma-related viral Macrophage inflammatory protein II</i>
LARC	<i>Liver and activation-regulated Chemokine (CCL20)</i>
MCP-1, -2, -3, -4,	<i>Monocyte chemotactic protein -1, -2, -3, -4 (CCL2, 7, 8, 13)</i>
MEC	<i>Mucosa-associated epithelial Chemokine (CCL28)</i>
MDC	<i>Macrophage-derived Chemokine (CCL22)</i>
Mig	<i>Monokine induced by Interferon-<math>\gamma</math> (CXCL9)</i>
mMCP-1	<i>murines MCP-1 (Ccl2)</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MPIF	<i>Myeloid progenitor inhibitory factor (CCL23)</i>
mRANTES	<i>murines RANTES (Ccl5)</i>
MRP-1,-2	<i>Macrophage inflammatory protein-related Peptide-1 (Ccl6), -2 (Ccl9)</i>
NAP	<i>Neutrophil-activating factor (CXCL7)</i>
PARC	<i>Pulmonary and activation-regulated Chemokine (CCL18)</i>
PF-4	<i>Platelet factor 4 (CXCL4)</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (CCL5)</i>
SCM-1 $\beta$	<i>Single C-motif-1<math>\beta</math> (XCL2)</i>
SDF-1	<i>Stromalcell derived factor (CXCL12)</i>
SLC	<i>Secondary lymphoid Chemokine (CCL21)</i>
SR-PSOX	<i>Scavenger receptor that binds Phophatidylserine and oxidized Lipoprotein (CXCL16)</i>
TARC	<i>Thymus and activation-regulated Chemokine (CCL17)</i>
TECK	<i>Thymus expressed Chemokine (CCL25)</i>

### Allgemeine Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Aquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz-Gen
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AP2	<i>Adaptor protein complex 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
bsAK	bispezifischer Antikörper
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat

CCL	CC-Motiv Chemokin Ligand
CCR	CC-Motiv Chemokin Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	CCAAT/ <i>enhancer binding protein</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CKR	Chemokinrezeptor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cRNA	komplementäre RNA
CsCl	Cäsiumchlorid
CXCL	CXC-Motiv Chemokin Ligand
CXCR	CXC-Motiv Chemokin Rezeptor
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR oder dhFr	Dehydrofolatreduktase
dGTP	Dedoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethyl sulfoxid
dNTP	Desoxynucleotid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSS	Dextran sodiumsulfate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DZ	Dendritische Zellen
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalitis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-1 $\alpha$	Elongationsfaktor 1 $\alpha$
<i>env</i>	<i>envelope</i>
EP	<i>Endogenous pyrogen</i> (Interleukin 1)
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>Fluorescence activated Cell Scan</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
G	Gauge
GCG	<i>Genetics Computer Group</i> (University of Wisconsin)
GDP	Guanosindiphosphat
GlyCAM-1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
gp	Glycoprotein
GPCR	G-Protein gekoppelte 7 Transmembran Rezeptoren
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HUSAR	Heidelberger Unix Sequence Analysis Resource
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon gamma

IP-10	<i>Inducible Protein 10</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol-Triphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
IS	Immenserum
IS+P	Immenserum plus Peptid
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KLH	<i>Carrier Protein Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
LAF	<i>Lymphocyte activating factor</i>
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LEM	<i>Leucocyte endogenous mediator</i>
LFA-1	<i>Leucocyte functional antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (mol/l)
mA	Milliampère
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
mCCR	muriner CC-Chemokinrezeptor (nach neuer Nomenklatur als Ccr bezeichnet)
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MDNCF	<i>Monocyte derived neutrophil chemotactic factor</i>
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MHV	<i>Mouse hepatitis virus</i>
min	Minute
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
mMCP	murines MCP
mMIP	murines MIP
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MNP	<i>MIP-1α nuclear protein</i>
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MP	Millipore
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
ms	Millisekunden
M-trop	Makrophagen-trop
Mtx	Methotrexat
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NAP	<i>Neutrophil-activating peptide</i>
NEB	New England Biolabs
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte



ori	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PF-4	<i>Platelet factor 4</i>
<i>Pfu</i> -Polymerase	hitze stabile DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-Diphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-Triphosphat
PIS	Präimmunsrum
PKB	Proteinkinase B
pmol	Picomol
PPD	<i>Positive Protein Derivative</i> (Mantoux Test)
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RFLAT-1	<i>RANTES factor of late activated T-lymphocytes-1</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
s.	siehe
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SOC	<i>Super optimal broth with glucose for catabolite repression</i>
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter</i> )
ssDNA	Einzelstrang ( <i>single strand</i> ) DNA
STAT-	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription protein</i>
SV-40	<i>Simian virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i> -Polymerase	hitze stabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline</i> mit Tween
T <sub>C</sub> 1	Typ 1 CD8 <sup>+</sup> -T-Killerzelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TGF-β	<i>Transforming growthfactor-beta</i>
T <sub>H</sub> 1	Typ 1 CD4 <sup>+</sup> -T-Helferzelle
TM	Rezeptor-Transmembrandomäne
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
US-FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VLA-4	<i>Very late antigen -4</i>
Vol	Volumen
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indo-1-β-D-Galaktopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

**Aminosäure-Symbole:**

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin.
W	Trp	Tryptophan
Q	Gln	Glutamin

**Nukleinsäure-Symbole:**

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe **PD Dr. Bruno Luckow** für die Stellung des Themas, die hervorragende Begleitung während der experimentellen Arbeit, sowie das kritische und konstruktive Korrekturlesen. Er hat durch viel Geduld und Schaffung bester Arbeitsbedingungen den Erfolg der Arbeit ermöglicht. Besonders danken möchte ich auch **Sylvia Chilla** (MTA) für die Einführung in das Labor und ihre ununterbrochene Hilfsbereitschaft. Meinen Freunden **Drs. Susanne und Erik Schadde**, die den ersten Kontakt zu Dr. Luckow und Prof. Schlöndorff hergestellt haben und meinem guten Freund **Dr. Florian Nickisch**, mit dem ich während des experimentellen Teils der Arbeit zusammenwohnte.

Weiterhin danke ich:

**Prof. Dr. Detlef Schlöndorff**, ehem. Direktor der Medizinischen Poliklinik der Universität München für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in sein Labor und seine Klinik. Ich habe von ihm sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Medizin viel gelernt. Bedanken möchte ich mich insbesondere auch für die weitere Unterstützung der Dissertation nach seinem Umzug in die USA.

**Prof. Dr. Matthias Mack** für die vielen Ideen und Vorarbeiten, sowie für die Einführung in die Durchflusszytometrie und die zur Verfügungstellung der *CHO/dhFr<sup>-</sup>*-Zellen, des Expressionsvektors *pEF-DHFR* und der rekombinanten Chemokine.

**Allen Mitarbeitern** der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik für die gute und kollegiale Atmosphäre. Hier speziell **Dr. Klaus Wagner** für die wertvollen Ratschläge und die ansteckende Faszination an der experimentellen Fragestellung. **Dr. Brigitte Banas** für die freundschaftliche Zusammenarbeit. **Dr. Holger Maier** für die rasche Hilfe bei jedem Computerproblem. **PD Dr. Stefan Segerer** für die Durchführung der Western Blots.

Meinem Vater **Dr. Paschen Simonis** für die lange großzügige Unterstützung und meiner Patentante **Heilwig Simonis** für das Korrekturlesen.

Mein unendlicher Dank gilt meiner Frau **Dr. Anja Kaltstein** und meinen Kindern **Alina, Fynn** und **Nick** für die Liebe, Geduld und Unterstützung während dieser schier nicht enden wollenden Doktorarbeit.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Christopher Eckart Simonis  
Geburtsdatum: 19.04.1970  
Geburtsort: Boston, USA  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Judith Simonis, geb. Henderson und  
Dr. med. Paschen Simonis  
Geschwister: Katrin Simonis  
Lebenspartner: Dr. med. Anja Kaltstein  
Kinder: Alina (\*25.06.1999), Fynn (\*27.03.2003), Nick (\*23.10.2005)

### Schulbildung:

1976-80 Grundschule Gilching  
1980-90 mathem. naturw. Gymnasium Gilching, Abitur (1,2)  
1987/88 Andover Highschool, USA Highschool Diplom (*High Honors*)

### Hochschulstudium an der Ludwig Maximilians Universität München:

1990/91 Neuere Geschichte, Spanisch  
1991-99 Humanmedizin Ärztliche Prüfung (1,66)

### Auslandsstudium:

1992/93 Facultad de Medicina, Universidad de Alicante, Spanien Erasmus-Stipendium  
1995-96 Charing Cross & Westminster Medical School, London, GB DAAD-Stipendium  
1998 Harvard Medical School, Boston, USA LMU-Harvard-Allianz

### Wissenschaftliche Arbeiten:

1994 Praktikum der Molekularbiologie, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried  
1994 Leitung und Durchführung einer epidemiologischen Studie im Auftrag von VIMZ  
(Verein für Internationale Medizinische Zusammenarbeit e.V.) über die  
Gesundheitsversorgung in Pedro Vicente Maldonado, Ecuador  
1997-1999 Durchführung des experimentellen Teils der Dissertation in der Arbeitsgruppe  
Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik der LMU-München  
(Direktor Prof. D. Schlöndorff, Laborleiter und Betreuer PD Dr. rer. nat. B. Luckow)

### Veröffentlichung:

Mack, M., Cihak, J., **Simonis, C.**, Luckow, B., Proudfoot, A., Plachy, J., Brühl, H., Frink, M., Anders, H. J., Vielhauer, V., Pfirstinger, J., Stangassinger, M. und Schlöndorff, D. (2001). "Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice." *J Immunol* **166**(7): 4697-4704.

### Ärztliche Tätigkeit:

1999-2001 Arzt im Praktikum an der Med. Poliklinik der LMU-München (Prof. D. Schlöndorff)  
2002-2007 Assistenzarzt an der III. Med. Klinik des Klinikums Augsburg (Prof. H. Messmann)  
2007 Assistenzarzt an der II. Med. Klinik des Klinikums Augsburg (Prof. G. Schlimok)  
6/2008 Annerkennung als Facharzt für Innere Medizin (Bayerische Landesärztekammer)  
10/2008 Niederlassung in eigener Praxis als Facharzt für Innere Medizin in München