Aus dem Institut für klinische Biochemie der Medizinischen Klinik
Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke)

GPI-verankertes mucin CXCL10 als potentielles Adjuvans moderner Tumortherapie

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

vorgelegt von

CONSTANTIN FREDERIK VICTOR LAPA

aus

MÜNSTER IN WESTFALEN

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Nelson
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Lars Lindner Priv. Doz. Dominik Ruettinger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Rogieh Djafarzadeh
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	24.03.2011

Inhalt:

I Zusammenfassung ... 1
II Einleitung ... 4
Entzündung ... 4
Tumorigenese ... 5
Tumor und Immunsystem ... 6
Chemokine ... 10
Rezeptoren ... 12
Interaktionen von Chemokinen und Glykosaminoglykanen ... 15
Chemotaxis, Haptotaxis, Chemokinese ... 16
Rolle der Adhäsion im Prozess der leukozytären Migration ... 16
Rolle der Chemokine bei der Rekrutierung von Leukozyten ... 17
Rolle der Chemokine in der Tumorigenese (incl. Angiogenese) ... 19
CXCL10 / IP 10 / „interferon-gamma inducible protein of 10 kDa“ ... 21
Die Struktur von IP10 / CXCL10 ... 23
Sekundärstruktur ... 23
Biologische Eigenschaften von IP10 / CXCL10 ... 24
Fractalkine (CX3CL1) ... 25
Glykosylphosphatidylinositol - Anker (GPI-Anker) ... 27
Fragestellung und das Ziel der Arbeit ... 29
III Material und Methoden: ... 34
Material ... 34
Medien und Zusätze ... 34
Mikrobiologie ... 34
Zellen ... 35
Rekombinante Proteine ... 36
Antikörper ... 36
Pufferlösungen ... 37
SDS-Page ... 39
Silberfärbung ... 39
Sonstige Lösungen ... 40
Größenstandard ... 40
Säulenchromatographie ... 40
Reagenzienpakete ... 41
Enzyme ... 41
Chemikalien ... 42
Geräte ... 42
Software ... 42
Sonstige Materialien ... 43
Methoden ... 43
Zellkultur ... 43
Ernten von Zellen ... 44
Einfrieren und Auftauen von Zellen ... 44
Bestimmung der Zellzahl ... 44
Proteinchemische Methoden ... 45
Aufreinigung von (mucin) CXCL10-GPI durch Säulenchromatographie ... 45
Heparinaffinitätschromatographie ... 50
Kationenaustauschchromatographie ... 50
Gelfiltrationschromatographie ... 51
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ... 51
Bestimmung der Proteinkonzentration mittels ELISA ... 51
SDS - Page ... 52
Electrotransfer und Blot - Analyse ... 53
Silberfärbung ... 53
In vitro Versuche ... 54
FACS – Analyse ... 54
Nachweis der Inkorporierung von CXCL 10 - GPI in die Zellmembran ... 56
Untersuchung der Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf THP-1-; HUT78- und YT-Zellen ... 57

Nachweis der Chemokin-Konstrukt vermittelten Lymphozytären Adhäsion an Endothelien unter Durchflussbedingungen (*flow adhesion assay*) ... 57
Fluoreszenzmikroskopie ... 60
Luciferase-Essay ... 62
Molekularbiologische Methoden ... 63
Allgemeine Methoden ... 63
Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel ... 63
Restriktionsverdau von DNA ... 63
Extraktion von DNA aus Agarosegelen ... 63
Dephosphorylierung der 5`-Enden von DNA-Strängen ... 63
Ligation von DNA-Fragmenten ... 64
Herstellung elektrokompetenter E. coli DH5α-Bakterien ... 64
Transformation von E. coli DH5α durch Elektroporation ... 64
Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli DH5α ... 65
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 65
RNA-Isolation aus CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen und reverse Transkription ... 66
Spezielle Methoden ... 67
Klonierung von CXCL10–GPI und mucin CXCL10-GPI ... 67
Subklonierung von (mucin) CXCL10-GPI ... 72
Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen ... 73
Transiente Transfektion von mikrovaskulären Endothelzellen ... 73
Magnetofection ... 73
Elektroporation ... 75
Proliferationsversuch ... 75
IV Ergebnisse ... 77
Klonierung und Expression von CXCL10–GPI und mucin CXCL10–GPI in CHO-Zellen ... 77
Nachweis der Expression der CXCL10-Konstrukte auf der Oberfläche der transfizierten Zellen ... 80
Aufreinigung von CXCL10-GPI mittels FPLC ... 82
Aufreinigung von CXCL10-GPI durch Heparin -Affinitätschromatographie ... 82
Aufreinigung von CXCL10-GPI durch Kationenaustauschchromatographie ... 85
Aufreinigung von CXCL10-GPI durch Gelfiltrationschromatographie ... 86
Bestimmung der Proteinkonzentration und der Ausbeute ... 90
Incorporierung von CXCL10-GPI in die Zellmembran ... 90
Aufreinigung von mucin CXCL10–GPI mittels FPLC ... 92
Aufreinigung von mucin CXCL10-GPI durch Heparin–Affinitätschromatographie ... 93
Aufreinigung von mucin CXCL10-GPI durch Kationenaustauscherchromatographie ... 94
Bestimmung der Proteinkonzentration und der Ausbeute ... 98
Incorporierung von mucin CXCL10-GPI in die Zellmembran mikrovaskulärer Endothelzellen ... 98
Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf der Zellmembran verschiedener Leukozytenzelllinien ... 99
Transiente Transfektion mikrovaskulärer Endothelzellen ... 101
Subklonierung von (mucin) CXCL10-GPI ... 101
Flow Adhesion Assay ... 106
Proliferation ... 110
V Diskussion ... 113
VI Ausblick ... 119
VII Abkürzungsverzeichnis ... 121
VIII Literaturverzeichnis ... 123
IX Curriculum Vitae ... 133

I ZUSAMMENFASSUNG

Chemokine sind eine Gruppe von kleinen, chemotaktisch wirksamen Proteinen, die als Mediatoren von vielen unterschiedlichen Gewebetypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten etc. ausgeschüttet werden können und bei den Prozessen der Embryogenese, der Homeostase, der Angiogenese und der Rekrutierung und Migration von Leukozyten eine Rolle spielen. Diese Eigenschaft kann in der Therapie maligner Erkrankungen genutzt werden: Durch die gezielte lokale Beeinflussung des Chemokin-Milieus soll ein gerichteter Einstrom von Leukozytenuntergruppen (sogenannte „*subsets*“) und somit eine gegen die entarteten Zellen gerichtete Entzündungsreaktion induziert werden. Die Bedeutung des körpereigenen Immunsystems in der Entstehung und Abwehr von malignen Tumoren ist dabei schon von Virchow 1858 erkannt worden („Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre“); während dieser jedoch in dem „lymphoretikulären Infiltrat“ chronischer Entzündungsprozesse die Ursache späterer Entartung sah, mehren sich heute Untersuchungen, die die anti-tumoröse Wirkung der Leukozyten betonen. Epidemiologische Studien mit immunsupprimierten Transplantatempfängern zeigen eine deutlich erhöhte Malignominzidenz in dieser Populationsgruppe.

Von besonderem Interesse in der Tumorbiologie ist das spezielle Mikromilieu (*„microenvironment“*), das sich der entartete Zellklon durch Ausschüttung parakrin wirksamer Faktoren oder Veränderung seiner an der Zelloberfläche exprimierten Marker schafft. Eine große Anzahl verschiedener biologisch aktiver Mediatoren wie Metallomatrixproteasen (MMP) oder Interleukine ist beschrieben worden. Eine gezielte Beeinflussung dieses speziellen tumoreigenen Milieus erscheint daher sinnvoll, um auf das Tumorwachstum einzuwirken und gleichzeitig das Immunsystem in seiner Abwehrfunktion zu stimulieren. Wichtig ist hierbei die Vorgabe, lokal begrenzt einzugreifen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war somit die Herstellung eines neuen rekombinanten Proteins, das als (lokal begrenzt wirksames) Adjuvans des Immunsystems eine Rolle in der Tumortherapie spielen könnte. Zu diesem Zweck wurde das proinflammatorische Chemokin CXCL10 (IP 10) auf DNA-Ebene mit einem Glykosylphosphatidylinositol- (GPI) Anker fusioniert und anschließend in eukaryotischen Zellen (*Chinese Hamster Ovary* [CHO]) stabil exprimiert.

IP 10, das jetzt vor allem als CXCL10 bekannt ist, ist ein entzündungsförderndes Chemokin mit einem Molekulargewicht von ca. 9 kDa, das pro-migratorische Effekte auf TH1-Helfer-, CD8-Killer- und NK-Zellen ausübt. Des Weiteren sind die im gegebenen Kontext besonders interessanten Effekte der Angiostase (Strieter *et al*., 1995) und der verminderten Metastasierung (Arenberg *et al.,* 1997; Luan *et al*., 1997) beschrieben worden. Das Protein übt somit anti-tumoröse Wirkung auf verschiedenen Wegen aus.

Der GPI-Anker ist in der Lage, das Chemokin in jedwede Zellmembran zu reinkorporieren; somit ist die Kreierung eines lokalen Konzentrationsgradienten, der seinerseits als Migrationssignal für spezifische Leukozytenuntergruppen wirkt, möglich.

Als Erweiterung dieses Modells wurde das Chemokin-GPI-Fusionsprotein weiterhin mit der „*mucin-like domain*“ des bisher in seiner Struktur einzigartigen Chemokins CX3CL1 (Fractalkine) versehen. Dieses Konstrukt bietet die Möglichkeit, sich bei der erwünschten Leukozytenrekrutierung vom endothelialen Besatz sonstiger adhäsionsvermittelnder Rezeptoren wie Integrinen emanzipieren zu können. Es eröffnet so die Möglichkeiten des im Englischen sogenannten „*tissue engineering*“; der Veränderung der Oberflächenstruktur von Zellen und Geweben, ohne dabei in das jeweilige Genom eingreifen zu müssen.

Die Expression der Konstrukte auf der Zelloberfläche der transfizierten Zellen wurde mittels FACS-Analyse nachgewiesen, ebenso die GPI-Verankerung.

Nach schonender Auslösung der Fusionsproteine aus den Zellmembranen wurde eine Aufreinigung durch Einsatz von Methoden der Chromatographie (FPLC) erzielt.

Die strukturelle und funktionelle Unversehrtheit der gewonnenen Konstrukte wurde mit Hilfe zweier Versuche überprüft: Die Re-Inkorporierung der aufgereinigten Proteine in die Zellmembranen von humanen dermalen Endothelzellen (HDBEC) bewies die Funktionalität des GPI-Ankers; die Durchführung eines sogenannten „*flow adhesion assays*“ sollte der Untersuchung der Funktionalität der Chemokin-Domäne dienen.

Da sich hier zunächst bei der Verwendung der aufgereinigten Konstrukte aufgrund zu niedrig eingesetzter Proteinmengen kein wesentlicher Effekt der Chemokine zeigte, wurden parallel zu den Aufreinigungsbemühungen mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) mit den jeweiligen Konstrukten CXCL10-GPI sowie mucin CXCL10-GPI transient mittels Elektroporation transfiziert. Nach Methodenoptimierung sowie Auswahl einer geeigneten Lymphozytenzelllinie wurde der Adhäsionsversuch wiederholt. Unter Scherkräften von 0,4 dyn/cm^2 konnten für beide Chemokine (mucin CXCL10-GPI > CXCL10-GPI) mehrere Adhäsionsereignisse detektiert werden, was für die Richtigkeit der der Arbeit zugrunde liegenden Hypothese bezüglich der Steuerbarkeit der Leukozytenmigration durch Chemokine und der Möglichkeiten des sogenannten „*cell surface engineering*“ spricht.

Nachdem zwischenzeitlich ein neues Aufreinigungsprotokoll für beide Proteinkonstrukte (mittels eines sogenannten „myc-*tags*“ [für Einzelheiten siehe die Dissertation von Fr. S. Böcker]) entwickelt worden war, konnte auch für die isolierten Proteine ein starker Trend zur gesteigerten Adhäsion von Leukozyten nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde die antiangiogenetische Potenz von CXCL10 in einem Proliferationsversuch mit mikrovaskulären Endothelzellen nachgewiesen.

Somit könnte durch die Verwendung der aufgereinigten Proteinkonstrukte (mucin) CXCL10-GPI eine zweifache adjuvante Strategie in der Onkologie verfolgt werden:

Chemotaktische Anlockung von Effektor-T-Zellen sowie zusätzlich Inhibition der Angioneogenese des Tumors.

II EINLEITUNG

ENTZÜNDUNG

Entzündungsprozesse gehören zu den zentralen Schutzmechanismen des Körpers. Entzündungen haben eine essentielle Funktion bei der Abwehr von Krankheitserregern, entarteten Zellen und Fremdkörpern.

Andererseits spielen sie eine Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen, bei denen eine fehlgeleitete Entzündungsreaktion das eigentliche Krankheitsbild hervorruft.

Bei jeder Entzündung findet ein in vielen komplexen Schritten ablaufender Vorgang statt. Dieser wird zunächst durch spezifische oder unspezifische Reize, wie das Vorhandensein von Krankheitserregern, ihrer spezifischen bakteriellen oder viralen Produkte, oder die Erkennung körperfremder oder entarteter Zellen durch das Immunsystem ausgelöst. Über die Produktion verschiedener Mediatoren durch ortsständige oder einwandernde Zellen kommt es zur chemotaktischen Anlockung spezifischer Effektorzellen aus dem peripheren Blutstrom. Durch Mediatoren wird ebenfalls die Expression verschiedener Oberflächenantigene, wie Integrine oder VCAM („*vascular cell adhesion molecules*“), am Endothel und auf den Effektorzellen angeregt, was in einem ersten Schritt zu Anheftung und Extravasation dieser Zellen und schließlich zur ihrer Aktivierung führt. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei der Regulation der Immunantwort durch ein komplexes Netzwerk von Cytokinen zu. Diese können auf unterschiedlichen Ebenen immunregulatorisch, d.h. aktivierend, supprimierend oder modulierend eingreifen. Dabei kommt es phasenabhängig durch die Freisetzung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren zu einer gesteigerten Durchblutung des betroffenen Gewebes, um einen erhöhten Zustrom der körpereigenen Abwehrzellen oder einen verbesserten Abtransport eventueller Toxine zu ermöglichen. Dieser ersten Phase folgt eine Permeabilitätserhöhung der Gefäße mit einer anschließenden Leukozytentransmigration aus dem Blutstrom ins entzündete Stroma.

Neben dem Kininsystem und den Arachidonsäurederivaten spielt die Proteinfamilie der Chemokine eine wichtige Rolle in diesen Prozessen, sorgen diese doch für die Rekrutierung der „passenden“ Leukozyten. Die Bedeutung der Chemokine für die Entzündungsreaktion wird durch die verheerenden Wirkungen einer überschießend fehlgeleiteten Bildung dieser Botenstoffe im Rahmen der Artherosklerose (Heller *et al*, 2006), eines Autoimmungeschehens wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, dem Asthma bronchiale und der Multiplen Sklerose (Liu *et al.*, 2001) oder auch im Rahmen von chronisch verlaufenden Transplantatabstoßungsprozessen (Nelson und Krensky, 2001) verdeutlicht und führte zu der Entwicklung bestimmter Antagonisten zur therapeutischen Verhinderung dieser deletären Effekte.

Andererseits kann die gesteuerte Erzeugung einer lokal begrenzten inflammatorischen Reaktion des Körpers unter anderen Umständen gewünscht und sinnvoll sein. Im Rahmen eines Tumorleidens wäre die forcierte körpereigene Auseinandersetzung mit dem entarteten Zellklon als Unterstützung der standardmäßig verabreichten zytostatischen Therapie vorteilhaft.

Dieser Ansatz soll im Folgenden genauer vorgestellt werden, zunächst soll aber ein kurzer Abriss der Tumorigenese und des Wechselspiels zwischen Tumor und Immunsystem erfolgen:

TUMORIGENESE

Damit sich eine Zelle strukturell und funktionell in einen Organismus integrieren kann, muss sie ihre Wachstumsvorgänge, ihre Differenzierung und ihre Beziehung zu den Nachbarzellen unter Kontrolle haben und dem Gesamten anpassen. Zu diesem Zweck besitzt jede Zelle eine Vielzahl von unterschiedlichen Genen, die diese Prozesse kontrollieren und das Zusammenspiel der unzähligen einzelnen Zellen gewährleisten. Diese Gene betreffen bevorzugt Vorgänge wie Neubildung, Ausreifung oder Absterben.

Im Laufe des Lebenszyklus einer Zelle häufen sich Mutationen in diesen Genen an. Die überwältigende Mehrzahl kann jedoch entweder repariert werden oder die gesamte Zelle tritt bei irreparablem Schaden in den Prozess des programmierten Zelltodes, die Apoptose, ein.

Manchmal können die entstandenen Schäden nicht ausgebessert werden und es kommt zu einer Akkumulation verschiedener Mutationen. Bei einer Anzahl von sechs Veränderungen des Genoms ist eine kritische Grenze erreicht: Die betroffene Zelle wandelt sich Schritt für Schritt in eine Tumorzelle um. Diese besitzt im Vergleich zu den unveränderten Zellen folgende Charakteristika:

- Störung der Genomintegrität wegen defekter DNA-Reparatur
- Deregulierung des Zellwachstums durch Überproduktion von Wachstumsstimulatoren oder Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren
- Störungen der Zellzykluskontrolle
- Unabhängigkeit von der Zell-Zell-Interaktion
- Störung der Apoptose, Angiogenese, Invasion und Metastasierung

Der Prozess der Tumorigenese selbst läuft formal betrachtet in vier Stadien ab:

- Initiation
- Promotion
- Progression

- Metastasierung

Die Initiation ist der erste Schritt in der Tumorigenese. Er besteht darin, dass ein genetischer Schaden gesetzt wird.

In der Phase der Promotion kommt es zur Proliferation der initiierten Zellen, so dass der primär auf eine einzelne Zelle begrenzte Schaden auf viele Tochterzellen übertragen wird.

In der anschließenden Progressionsphase vollzieht sich der endgültige Übergang zur neoplastischen Zelle, von der letztlich die klonale maligne Proliferation ausgeht. Diese Phase der Tumorigenese ist am ungenauesten definiert, da teilweise mehrere Jahrzehnte zwischen dem Initiationsprozess und der klinischen Manifestation eines Tumors liegen können.

Mit zunehmender Progression verlieren die maligne entarteten Zellen ihre Differenzierungsmerkmale und damit ihre Zell-Zell-Interaktionen, was schlussendlich in der Streuung von Tochterzellen im Organismus und dem Heranwachsen von Tochtergeschwulsten gipfelt.

Als cancerogene Promotoren sind dabei eine Menge chemischer Substanzen, physikalischer Kräfte wie ionisierende Strahlung oder aber Viren bekannt. All diesen unterschiedlichen Bedrohungen des Genoms muss der Organismus eine Abwehr gegenüberstellen; dabei spielen die Reparaturmechanismen und, bei schon eingetretener Entartung, die Antitumor-Effektormechanismen des humoralen und zellulären Immunsystems eine herausragende Rolle. Dabei geht es vor allem darum, die veränderten Zellen zu erkennen und effektiv auszuschalten.

TUMOR UND IMMUNSYSTEM

Die ersten Gedanken, dass das Immunsystem die ansonsten überschießende Frequenz von Carcinomen eindämmen könnte, gehen bereits auf Paul Ehrlich („Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung“, 1909) zurück; seine Ideen wurden allerdings bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts nicht weiter verfolgt. Es dauerte bis zur Entwicklung der Immunologie und den Arbeiten Medawars in den 50er Jahren, bis die kritische Rolle des Immunsystems bei der Abwehr von körperfremden Zellen in Form der Abstoßungsreaktion von Allografttransplantaten erkannt wurde. Weitere Arbeiten entwickelten das Konzept von körperfremden und tumor-spezifischen Antigenen, gegen die sich die Immunreaktion richten kann (Old *et al*., 1964; Klein, 1966).

Alle diese und die nachfolgenden Erkenntnisse gipfelten in der Theorie der Immunüberwachung von Burnet, die eine Funktion des Immunsystems in der Erkennung und Eliminierung maligne entarteter Zellen postulierte (Burnet, 1970).

Nach Veröffentlichung der neuen Hypothese wurden zahlreiche Experimente zur Veri- oder Falsifizierung derselben unternommen: Eine Immunsuppression sollte demnach zu einer erhöhten Inzidenz an Tumoren führen. Während manche Gruppen frühzeitig eine Thymektomie an Versuchstieren zur Kompromittierung des T-Zell-Systems durchführten, verwandten andere Anti-Lymphozyten-Sera: die Ergebnisse waren bei allen Forschungsgruppen uneinheitlich (Stutman, 1975; Grant und Miller, 1965; Trainin *et al*., 1967; Burstein, 1971; Klein, 1973). Es wurden lediglich eine erhöhte Anfälligkeit für virale Prozesse und die Bildung von Lymphomen beobachtet: Beide Effekte wurden der verminderten Abwehr viraler Krankheitserreger und der damit verbundenen konsekutiven dauernden Stimulation des lymphozytären Systems zugeschrieben. Letztere sollte eine gesteigerte Proliferation, Rate an somatischen Mutationen und schließlich auch Lymphomen nach sich ziehen (Klein, 1973).

Letztendlich waren aber die Ergebnisse insgesamt zu uneinheitlich, um die von Burnet vorgeschlagene Hypothese zu beweisen oder zu entkräftigen.

Im Laufe der folgenden Jahre verminderte sich, auch aufgrund der Arbeiten O. Stutmans, der in seinen Experimenten an athymischen nackten Mäusen keine höhere Inzidenz an soliden Tumoren im Vergleich zur Wildtypgruppe feststellen konnte (Stutman,1973 und 1974), das Interesse an der Theorie der immuneigenen Tumorüberwachung, so dass die gesamte Theorie 1978 für tot erklärt wurde.

Diese Einstellung zeigt sich auch noch in einer Übersichtsarbeit Hanahans (Hanahan und Weinberg, 2000), die die entscheidenden Hürden in der Tumorentwicklung auflistete und dabei die Umgehung der Eliminierung durch das menschliche Immunsystem ausließ.

Ab Mitte der 90er Jahre jedoch sollten zwei Entdeckungen zur Renaissance der These der Tumorimmunüberwachung führen: Zum einen konnte von mehreren Arbeitsgruppen die carcinoprotektive Wirkung von endogenem Interferon-γ (IFN-γ) gezeigt werden (Dighe *et al*., 1994; Kaplan *et al*., 1998; Street *et al*., 2001), zum anderen wurde ein ähnlicher Effekt für Perforin, einem Bestandteil der zytotoxischen Granula von NK- und CD8-Zellen, der eine Rolle in der T-Zell vermittelten Zytotoxizität spielt, gefunden (Russell und Ley, 2002).

Zusammengefasst legten alle diese Beobachtungen eine Rolle des Immunsystems in dem Prozess der Kontrolle der Tumorentstehung und –ausbreitung nahe. Diese Ergebnisse wurden durch unzählige neuere Forschungsergebnisse mit Versuchen an Mäusen mit nun definierten Immundefekten unterstützt.

Auch beim Menschen zeigt sich eine höhere Inzidenz an Malignomen, wenn das Immunsystem geschwächt wird: Studien aus Skandinavien, Neuseeland und Australien zeigten eine größere Anzahl sowohl an „flüssigen“ (NHL, Mb. Hodgkin) als auch an soliden Tumoren (anorektal, genitourinal, Melanom) bei Transplantatempfängern (Penn, 1999; Birkeland *et al.*, 1995; Sheil, 2001). Während man das gesteigerte Vorkommen der

Lymphome oder analen Carcinome aufgrund ihrer Verbindung zu viralen Infektionen mit z.B. Epstein-Barr- oder HP-Viren mit der gegenüber infektiösen Organismen geschwächten Immunabwehr erklären kann, untermauern vor allem das nach einer Organtransplantation z.T. um das 4fache erhöhte Auftreten maligner Melanome oder die erhöhte Inzidenz an Bronchialcarcinomen die Funktion des Immunsystems auch für solide Tumore (Penn, 1996; Pham *et al*., 1995; Sheil, 2001).

Zusätzlich zeigte eine Untersuchung von 5692 nierentransplantierten Patienten in Finnland, Dänemark, Norwegen und Schweden ein höheres Risiko dieser Gruppe für eine Vielzahl solider Tumore wie Colon-Ca, Bronchial-Ca, Nieren-Ca, urotheliales und endokrines Ca (Birkeland *et al*., 1995).

Neben diesen epidemiologischen Studien existieren Beobachtungen, dass die Anzahl der einen Tumor infiltrierenden Lymphozyten ein prognostischer Faktor für das Überleben des Patienten ist: Die überzeugendsten Ergebnisse stammen hierbei aus Studien mit Patienten, die an einem malignen Melanom erkrankt sind. Es wurde gezeigt, dass Patienten mit einer deutlichen lymphozytären Infiltration des Tumors eine bis zu 1,5fach verlängerte Überlebenszeit hatten (Clark *et al*. 1989; Clemente *et al*., 1996).

Eine ähnlich positive Korrelation konnte für viele andere Tumorentitäten gefunden (Mamma, Blase, Colon, Prostata, Rektum) und teilweise für die Infiltration des Tumors mit CD8 positiven Zellen spezifiziert werden (Wahlin *et al*., 2007).

So effektiv und wichtig die protektiven Funktionen des Immunsystems auch sein mögen, sie sind nicht perfekt, kommt es doch auch bei immunkompetenten Personen zum spontanen Auftreten maligner Erkrankungen.

Es wird hierbei angenommen, dass durch den vom Immunsystem auf den Tumor ausgeübten Selektionsdruck diejenigen Klone selektioniert werden, die eine geringere Immunogenität besitzen und so den Abwehrzellen entkommen können. Da diese Anhäufung von Mutationen durch die Angriffe des Immunsystems gefördert wird, wurde die ursprüngliche These der Immunüberwachung zur Theorie der Immuneditierung erweitert. Dunn *et al*. schlagen hierbei ein Modell mit drei Phasen vor, welche die Elimination des Tumors, ein folgendes Equilibrium von überlebenden Tumorzellen und Immunsystem und ein anschließendes „*escape*“-Phänomen des nun relativ wenig immunogenen Zellklons beinhalten (Dunn *et al.*, 2002).

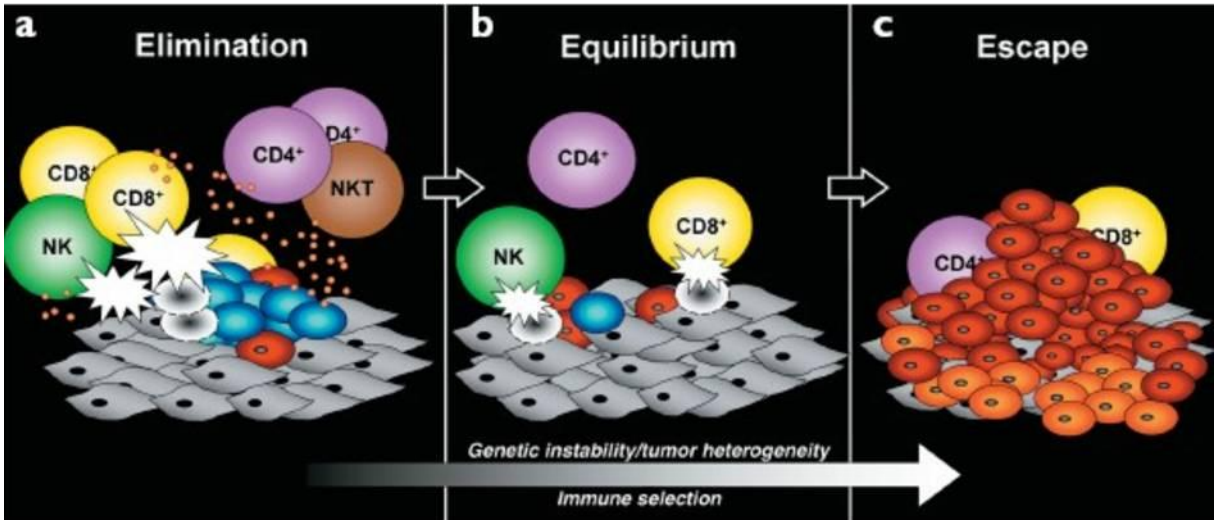


Abb.1: Die drei „E" der Tumorimmuneditierung. Die Tumorimmuneditierung umfasst drei Prozesse: **a) Elimination** durch Immunüberwachung, **b)** Die Phase des **Equilibrium**s stellt den Prozess der Auslese derjenigen Tumorzellklone dar, die eine gesteigerte Fähigkeit besitzen, die Angriffe des Immunsystems zu überleben. c**) „Escape**" beschreibt die unkontrollierte Expansion des zuvor selektionierten Tumors im immunkompetenten Organismus. In den Abschnitten **a)** und **b)** sind die sich entwickelnden Tumorzellen in blau, „fertige" Tumorklone in rot und die untransformierten, normalen Stromazellen in grau dargestellt, in **c)** wird zusätzlich in orange die Tumorzellvariante gezeigt, die sich aufgrund des Prozesses des Equilibriums herausgebildet hat. Die einzelnen Lymphozytenpopulationen sind jeweils direkt markiert, die kleinen orangenen Kreise in **a)** stellen Cytokine, die weißen Blitze die antitumorale zytotoxische Aktivität der Lymphozyten dar. (Mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, Dunn *et al*., 2002)

Während der primären Eliminations-Phase spielen Chemokine im Rahmen der Leukozytenrekrutierung und Angiogenese bzw. -stase eine bedeutende Rolle. Dabei beginnt der gesamte Prozess durch das Erkennen transformierter Zellen durch Natürliche Killer- oder T-Zellen und die darauf folgende Produktion von Cytokinen wie Interferon-γ.

Dies führt zur weiteren Stimulation des Immunsystems und einer Induktion von angiostatisch wirksamen Chemokinen wie z.B. CXCL10 (IP10), CXCL9 oder CXCL11. Diese Effektormoleküle hemmen zum einen die tumoreigene Neovaskularisation und beeinflussen darüberhinaus die Rekrutierung und Aktivierung immunokompetenter Zellen wie NK- Zellen (Natürliche Killerzellen) oder Makrophagen, die ihrerseits zytotoxisch auf den entarteten Zellklon wirken. Im Rahmen der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem gehen einige entartete Zellen zugrunde, deren Zelldebris mit den Makrophagen oder dendritischen Zellen in die drainierenden Lymphknoten gelangt. Dort entwickelt sich nun die spezifische Immunantwort in Form von CD4- und CD8- Zellen, die in der Lage sind, Zellen, die Tumorantigene auf ihrer Oberfläche exprimieren, zu erkennen und zu zerstören.

Die Wanderung dieser Zellen in das Gebiet des Tumors wird hierbei durch einen Gradienten von Chemokinen (chemotaktische Cytokine) gesteuert.

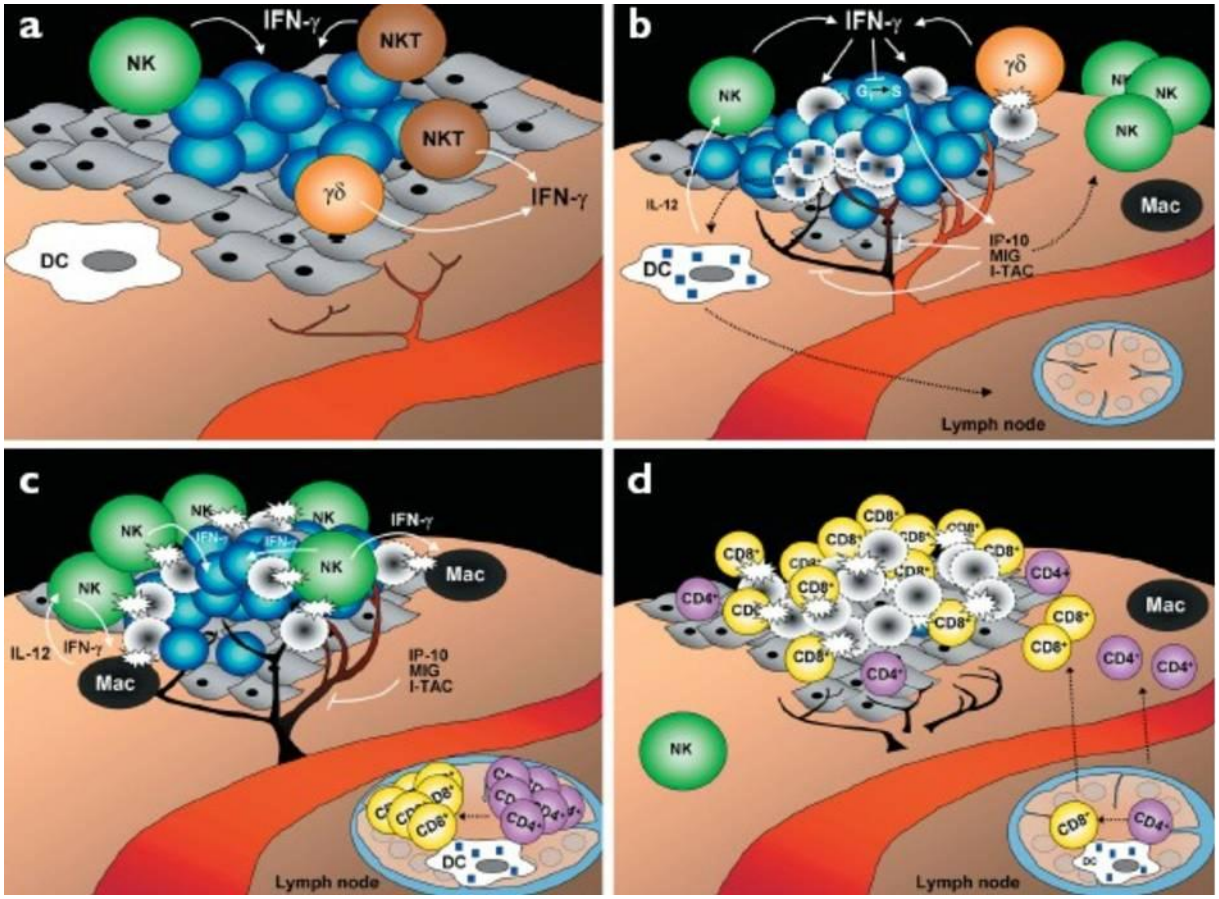


Abb.2: Modell der Eliminationsphase im Prozess der Tumorimmuneditierung
a) Mitglieder des angeborenen Immunsystems erkennen transformierte Zellen und schütten IFNχ aus. **b)** IFNχ startet die Abwehrkaskade und führt zur Sekretion von CXCL9 oder CXCL11, die die Neovaskularisation des Tumors hemmen und gleichzeitig weitere immunkompetente Zellen (weitere NK-Zellen, Makrophagen) anlocken und aktivieren. Antigene abgetöteter Zellen werden durch Antigen-präsentierende Zellen in die drainierenden Lymphknoten abtransportiert. Dort kommt es zu **c)** der Ausbildung einer spezifischen Immunantwort in Form von CD4- und CD8- Zellen. **d)** Das Wachstum des Tumors wird durch die Aktivität der NK-Zellen, der aktivierten Makrophagen sowie der Lymphozyten kontrolliert Die tumorspezifischen Abwehrzellen wandern entlang eines Chemokingradienten in das Gebiet des entarteten Klons und zerstören maligne Zellen, die die Tumorantigene auf ihrer Oberfläche exprimieren. (Mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, Dunn *et al.*, 2002)

Chemokine spielen somit durch die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems und die angiostatischen Effekte sowohl in der Initiierung der körpereigenen Tumorzellabwehr als auch durch die migrationssteuernde Wirkung auf CD4- und CD8- Zellen in den späteren, tumorspezifischen immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Daher soll diese Proteingruppe genauer vorgestellt werden.

CHEMOKINE

Chemotaktische Zytokine (Chemokine) sind eine schnell wachsende Gruppe von Mediatoren

mit einem geringen Molekulargewicht von 8 bis 11 kDa, die in vielen biologischen Prozessen wie der Embryo-, Angio- und Hämatogenese eine Rolle spielen (Luster *et al*., 1998). Sie können weiterhin die Wanderung von Leukozyten entsprechend ihres Konzentrationsgradienten steuern und die Extravasation der Abwehrzellen sowie deren Aktivierung und Proliferation hervorrufen. Chemokine werden nach ihrer chemischen Struktur je nach Lage ihrer Doppelbindungen in C, CC, CXC und nach neuesten Forschungsergebnissen CX3C Chemokine eingeteilt, wobei der Buchstabe „C“ für den Rest der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein und der Buchstabe „X“ für einen beliebigen Rest stehen (s.u.). Durch Bindung an Chemokinrezeptoren, G-Protein-assoziierte Rezeptoren aus der Klasse der Sieben-Trans-Domänen-Rezeptoren, werden die Signale transduziert und ins Innere der Zelle weitergegeben, wo sie eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen auslösen können.

Chemokine können einerseits von verschiedenen Zell- und Gewebearten wie z.B. Fibroblasten oder Endothelzellen in Antwort auf einen pro-inflammatorischen Reiz hergestellt und sezerniert werden (Taub, 1996; v. Luettichau *et al*., 1996); andererseits sind sie in bestimmten Umgebungen (Embryo-, Angio- und Hämatogenese) dauerhaft exprimiert (Rossi und Zlotnik, 2000; Nelson und Krensky, 2001).

Chemokine üben eine chemotaktische Wirkung auf bestimmte Leukozyten-Subpopulationen aus und induzieren somit über ihren lokalen Gradienten eine Migration der Abwehrzellen aus dem Blutstrom in das z.B. entzündete Gewebe (Springer, 1994; Kunkel und Godessart, 2002). Die Interaktion der Leukozyten mit dem jeweiligen Gefäßendothel ist hierbei von dem Zelloberflächenbesatz an Adhäsion-vermittelnden Rezeptoren wie Selektinen und Integrinen und natürlich der Expression des jeweiligen Chemokin-Rezeptors abhängig. Nur ein koordiniertes Zusammenspiel all dieser Elemente kann eine Diapedese der Leukozyten in das Gewebe ermöglichen.

Bis zum heutigen Tag sind mehr als 50 verschiedene Chemokine und 21 Rezeptoren beschrieben worden (Murphy *et al*., 2000; Rossi und Zlotnik, 2000; Segerer *et al*., 2000), wobei die Mediatoren in vier „Familien“ eingeteilt werden: Die Gruppierung erfolgt, wie bereits oben erwähnt, unter strukturellen Gesichtspunkten: Alle Chemokine besitzen am Amino-Terminal ihrer Primärstruktur ein Motiv von vier Cysteinyl-Resten. Die Lage der ersten beiden Reste dieses Motivs und eine eventuelle Trennung durch eingeschobene Aminosäuren-Reste, die mit „X“ bezeichnet werden, ergibt folgende Gruppen: C- (γ-Chemokine), CC- (ß-Chemokine), CXC- (zuerst beschrieben und deshalb auch α-Chemokine) und CX3C- (δ-Chemokine).

Eine Untergruppe der CXC- Chemokine besitzt zusätzlich ein aus den Aminosäuren E-L-R (Glutamat-Leucin-Arginin) bestehendes, der CXC-Domäne vorangehendes Motiv, das Zellen, die Proteine dieser Familie auf ihrer Oberfläche präsentieren, für eine Wirkung auf neutrophi-

le Granulozyten prädisponiert und mit angiogenetischen Effekten assoziiert ist. Chemokine der CXC-Familie ohne das genannte Motiv hingegen üben ihre Effekte bevorzugt auf Lymphozyten aus und besitzen eine angiostatische Wirkung.

Während die meisten der bisher bekannten Vertreter der Chemokine der CC- und der CXC-Familie angehören, bestehen die anderen beiden Gruppen aus einer wesentlich leichter überschaubaren Anzahl von Mitgliedern: Die C- Gruppe besteht aus Lymphotactin-alpha und -beta; beide besitzen nur zwei Cysteinyl-Reste (Kelner *et al*., 1994). Von den CX3C-Chemokinen ist bis zum heutigen Tag als einziger Vertreter lediglich Fractalkine/CX3CL1 beschrieben worden. Dieses Protein ist insofern interessant, da es, über eine Transmembrandomäne direkt in die Zellmembran gebunden, durch eine in ihrer Funktion mit Adhäsionsmolekülen vergleichbare Mucin-ähnliche Domäne relativ unabhängig von den sonst notwendigen Co-Stimuli wie Selektinen und Integrinen v.a. T-Lymphozyten und Monozyten mittels seiner Chemokin-Domäne rekrutieren kann (Umehara *et al*., 2004).

REZEPTOREN

Alle Rezeptoren für Chemokine gehören der Gruppe der G-Protein gekoppelten, sieben Transmembrandomänen besitzenden Rezeptoren an (Murphy *et al*., 2000; Rossi und Zlotnik, 2000; Sallusto *et al*., 2000). Dabei wird jeder Rezeptor spezifisch von einer verschiedenen Art und Anzahl von Leukozyten exprimiert und interagiert seinerseits auch nur mit einer bestimmten, „passenden" Untergruppe von Chemokinen.

Allerdings existiert eine bestimmte Kreuz-Spezifität eines Rezeptors für mehrere Mediatoren und *vice versa*, wobei man hier generell sagen kann, dass die Rezeptoren der pro-inflammatorisch wirksamen Chemokine eher zu einer mehrfach gearteten Interaktion neigen, während diejenigen Rezeptoren, die das normale Extravasationsverhalten der Leukozyten im Sinne der Homöostase beeinflussen, eher weniger bis nur einen einzigen Liganden besitzen (Nelson und Krensky, 2001). Insgesamt kann man aber von einer gewissen Redundanz im gesamten System der Chemokin-vermittelten Signaltransduktion sprechen.

Die zur Beschreibung und Einordnung der verschiedenen Rezeptoren gebräuchliche Nomenklatur basiert auf der Klasse von Chemokinen, die mit dem jeweiligen Rezeptor interagiert: So werden C-, CC-, CXC- und CX3C-Rezeptoren unterschieden (Murphy *et al*., 2000; Rossi und Zlotnik, 2000, Baggiolini, 2001).

Als Überblick über das bisher Gesagte dient Abbildung 3, die die jeweiligen Rezeptoren mit ihren Liganden darstellt und dabei die Rezeptoren nach Spezifität (spezifisch/nicht-spezifisch) oder Herkunft (viral) einteilt. Übrig bleibt eine letzte Gruppe zweier Rezeptoren, die keine Signalkaskade aktivieren können (*non-signalling*).

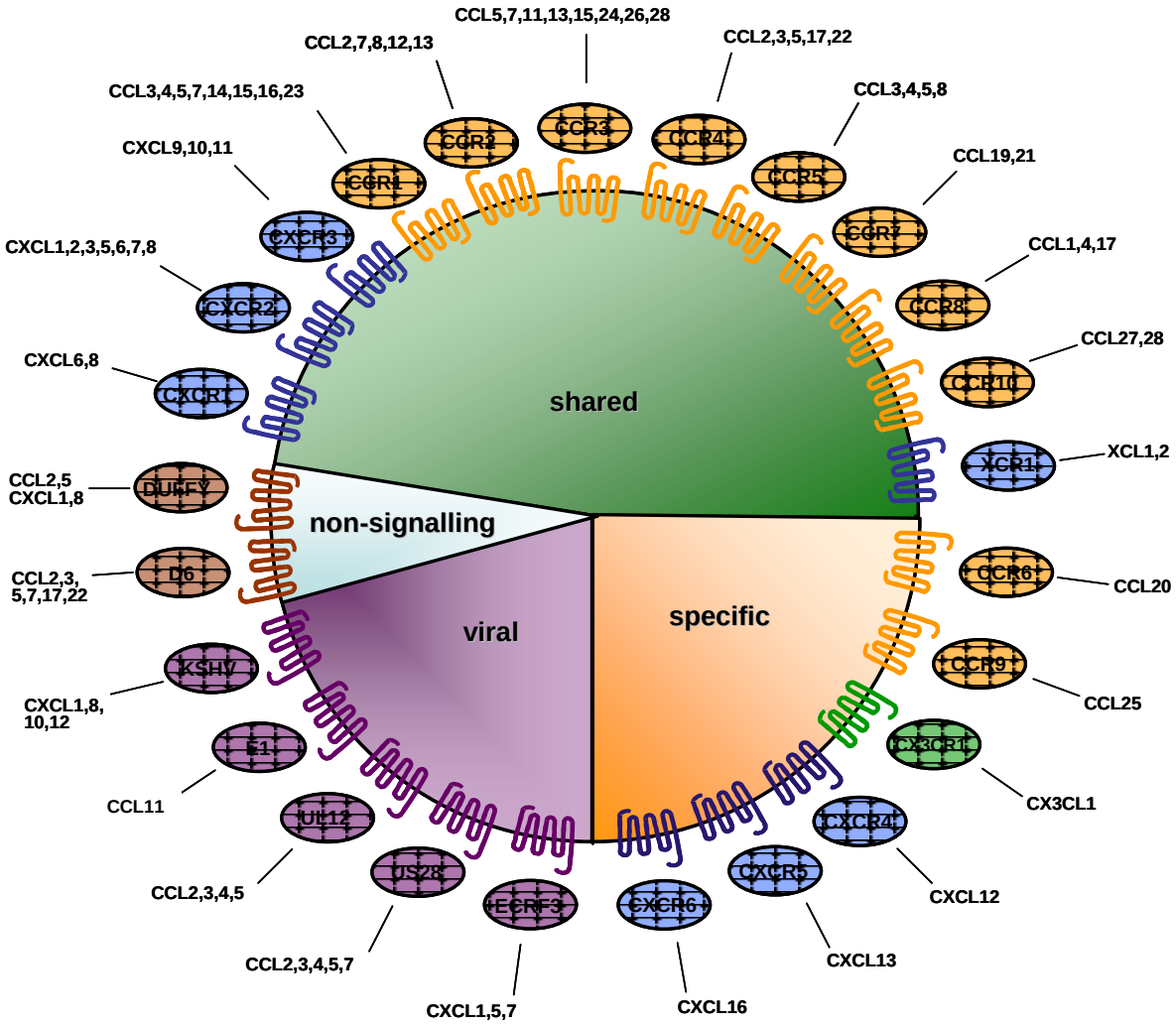


Abb.3: Familie der Chemokine mit zugehörigen Rezeptoren. Diese Abbildung teilt die jeweiligen Rezeptoren mit ihren zugehörigen Chemokinen nach Spezifität in „spezifisch“ und „nicht-spezifisch“ (*specific vs. shared*) sowie der Herkunft entsprechend in „viral“ (*viral*) ein; übrig bleiben zwei Rezeptoren, die keine Signalkaskade aktivieren können (*non-signalling*) und ebenfalls eine eigene Gruppe bilden. Abkürzungen siehe Erläuterung zu Abbildung 4.

Durch die Bindung eines Liganden an den passenden Rezeptor wird G-Protein-vermittelt eine Signaltransduktionskaskade angestoßen, die zu einer Aktivierung der Phospholipasen C α1 and α2 mit der konsekutiven Generierung von Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol (DAG) führt. Dies wiederum zieht einen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration mit daran gekoppelter Aktivierung der Phosphokinase C nach sich. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade sind verschiedene Kinasen, wie z. B. Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen involviert. (Murphy *et al.*, 2000; Segerer *et al.*, 2000).

Um die Anzahl der verschiedenen Möglichkeiten eines Chemokin-Signals noch weiter hervorzuheben, seien an dieser Stelle nur die unterschiedlichen „cross-talk“- Möglichkeiten

differenter Signalwege, das Vorkommen posttranslationeller Modifikationen und die Bildung von Heterodimeren erwähnt (Murphy *et al*., 2000; Nelson *et al*., 2001). All diese Variablen sorgen für die große Komplexizität des menschlichen Immunsystems und erklären damit gleichzeitig die Schwierigkeiten, durch die Beeinflussung eines Faktors einen gewünschten Effekt erzielen zu wollen, da immer eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege betroffen ist.

Abbildung 4 zeigt zusammenfassend die unterschiedlichen Strukturmerkmale der verschiedenen Chemokinsubfamilien, die entsprechenden Rezeptoren und in einer dritten Spalte diejenige Leukozytenpopulation, die vom jeweiligen Chemokin bevorzugt aktiviert wird.

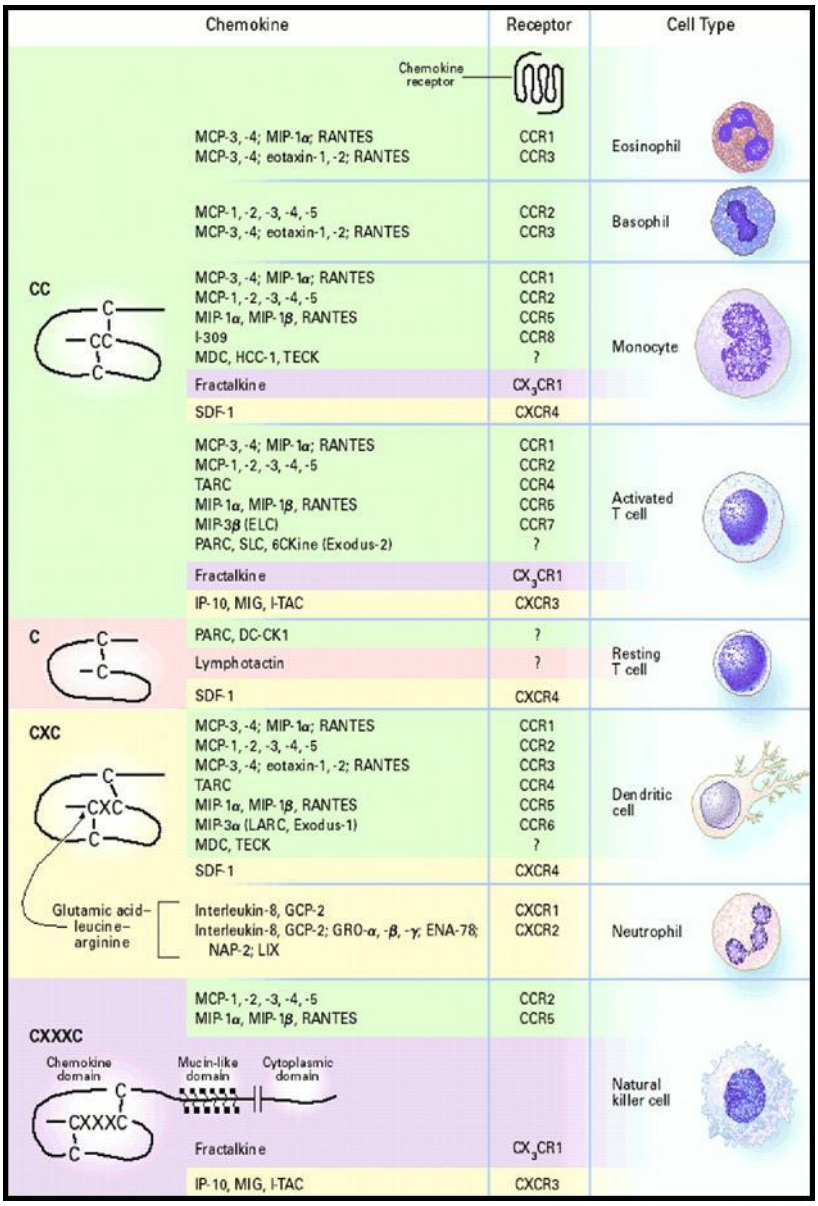


Abb.4: Chemokine und ihre Rezeptoren. Chemokine sind homologe Proteine, die entsprechend der relativen Position von Cysteinyl-Resten in der Aminosäuresequenz in Subfamilien eingeteilt werden. Bei den {alpha}-Chemokinen werden die ersten beiden Cysteinyl-Reste von einer einzigen Aminosäure getrennt, während bei den {beta}-Chemokinen die beiden Reste direkt nebeneinander liegen (CC). Die {alpha}-Chemokine, die die

Sequenz Glutamat -Leucin-Arginin vor der CXC Sequenz enthalten, wirken auf Neutrophile chemotaktisch, diejenigen ohne das Motiv üben ihren Effekt auf Lymphozyten aus. Das C Chemokin Lymphotactin besitzt lediglich zwei Cysteine, bei dem CXXXC-Chemokin Fractalkine trennen drei Aminosäuren die ersten beiden Cysteine. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Proteine, die auf verschiedenen Leukoztensubgruppen exprimiert werden. Vier humane CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR1 bis CXCR4), acht humane CC-Chemokinrezeptoren (CCR1 bis CCR8), und ein humaner CXXXC-Chemokinrezeptor (CX3CR1) sind bisher identifiziert worden. MCP: monocyte chemoattractant protein, MIP: macrophage inflammatory protein, RANTES: regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, MDC: macrophage-derived chemokine, HCC-1: hemofiltrate CC-chemokine, TECK: thymus-expressed chemokine, SDF-1: stromal-cell-derived factor 1, TARC: thymus and activation-regulated chemokine, ELC EBI1: (Epstein-Barr virus-induced gene 1)-ligand chemokine, PARC: pulmonary and activation-regulated chemokine, SLC: secondary lymphoid-tissue chemokine, 6Ckine: 6-cysteine chemokine, IP-10: interferon-inducible protein 10, MIG: monokine induced by interferon-{gamma}, I-TAC: interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, DC-CK1: dendritic-cell chemokine 1, LARC: liver and activation-regulated chemokine, GCP: granulocyte chemotactic protein, GRO: growth-regulated oncogene, ENA-78: epithelial-cell-derived neutrophil-activating peptide 78, NAP-2: neutrophil-activating peptide 2, LIX: lipopolysaccharide-induced CXC chemokine (aus: Luster, A.D. , Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med*. 338, 436-445. Mit freundlicher Genehmigung des *New England Journal of Medicine*).

INTERAKTIONEN VON CHEMOKINEN UND GLYKOSAMINOGLYKANEN

Zusätzlich zu der oben skizzierten Interaktion von Chemokinen mit ihren Rezeptoren ist eine weitere Wechselwirkung von Relevanz: Um von dem auf dem entsprechenden Leukozyten exprimierten Rezeptor erkannt zu werden, bedarf es von Seiten des Chemokins der Präsentation durch Glykosaminoglykane (GAG). Diese sollen die Diffusion der kleinen Proteine von ihrem Bildungsort verhindern und somit zur Bildung eines wirkungsvollen „Lockgradienten“ beitragen. Dabei spielt die negative Ladung der GAG im Sinne der Bindung mit dem mehrheitlich positiv geladenen Chemokins eine fördernde Rolle. Die Glykosaminoglykane sind lange, lineare Proteine, die mit diversen Sulfatresten konjugiert sind und mit Ausnahme der löslichen Vertreter Hyaluronsäure und Heparin entweder eng mit der Zellmembran assoziiert oder in diese inkorporiert sind (Salmivirta *et al*., 1996; Turnbull *et al*.; 2001). Neben der bekannten Rolle dieser Proteine in den Prozessen der Signaltransduktion, Zelladhäsion und des Lipidmetabolismus (Sasisekharan und Venkataraman, 2000; Tumova *et al*., 2000) liegt eine weitere Bedeutung in der Bindung von Chemokinen (Kuschert *et al*., 1999). Diese Interaktion stellt eine absolut notwendige Bedingung für die Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen einer Entzündungsreaktion dar (Proudfoot *et al*., 2003), d.h., ohne die „richtige“ Präsentation des jeweiligen Chemokins auf der z.B. endothelialen Zelloberfläche durch ein entsprechendes GAG bleibt die Mediatorenausschüttung aufgrund der mangelnden Etablierung eines lokalen Gradienten folgenlos; die notwendige feste Adhäsion der Abwehrzellen als erster notwendiger Schritt der nachfolgenden gewünschten Diapedese kann nicht stattfinden.

Die Bindung des Chemokins erfolgt hierbei bevorzugt über das „BBXB-Motiv“, wobei „B“ für eine basische Aminosäure (Arginin, Lysin und –selten- Histidin) steht und „X“ jede beliebige Aminosäure bezeichnen kann (Goger *et al*., 2002; Proudfoot *et al*., 2001). Die

Bindung erlaubt im weiteren Verlauf eine Oligomerisierung der Botenstoffe, was für die *in vivo* Funktionalität der Proteine von wesentlicher Bedeutung ist (Proudfoot *et al*., 2003).

CHEMOTAXIS, HAPTOTAXIS, CHEMOKINESE

Die durch einen chemoattraktiv wirkenden Botenstoff ausgelöste leukozytäre Migration kann durch dessen chemotaktische, haptotaktische und chemokinetische Effekte verursacht sein. Der Begriff der Chemotaxis ist hierbei als die unidirektionale Bewegung von Zellen in Richtung eines löslichen Gradienten einer chemischen Substanz definiert.

Haptotaxis beschreibt dahingegen eine durch einen an eine Oberfläche gebundenen Stoff hervorgerufene Bewegung. Diese beiden unidirektionalen Prozesse können in einem nächsten Schritt gegen die Chemokinese, eine zufällige, multidirektionale Migration einer stimulierten Zellpopulation, abgegrenzt werden. Untersuchungen ergaben, dass der hauptsächliche Effekt der Chemokine ursächlich auf den Phänomenen der Chemo- und Haptokinese beruht. Dabei ist der Vorgang der Adhäsion von Leukozyten von besonderer Bedeutung:

ROLLE DER ADHÄSION IM PROZESS DER LEUKOZYTÄREN MIGRATION

Die Lokomotion von Leukozyten erfordert neben einer Aktin-abhängigen Änderung der Zellform die Formation von Pseudopodien sowie ein Wechselspiel von Kontraktion und Adhäsions- und De-Adhäsionsprozessen. Die Bindung an ein Substrat ist für die Fortbewegung von Leukozyten essentiell und steht damit im krassen Gegensatz zu der eher frei schwimmenden Aktion von Bakterien.
Während eines Lokomotions-Zyklus einer Abwehrzelle können verschiedene Phasen erkannt werden: Induktionsschritt, Membranprotusion am vorderen Pol („Front“) der Zelle mit Adhäsion, gefolgt von Kontraktion und anschließender Ablösung am hinteren Pol („Heck“).
Die Membranproteingruppe der Integrine soll in der Adhäsionsphase dabei die entscheidende Rolle spielen. Für eine optimale Lokomotion wird eine optimale Bindung verlangt: Eine zu starke Bindung würde das Weiterkommen verhindern, während eine zu schwache nicht genügend Traktion aufbringen könnte. Der für den jeweiligen Zweck „perfekte“ Besatz der Zellen mit Integrinen ist somit Voraussetzung für eine gelingende Migration.
Chemokine können den Besatz von Zelladhäsionsmolekülen von Leukozyten hochregulieren und somit den Adhäsionsprozess fördern. Dieser wird durch mindestens zwei sequentiell ablaufende Schritte beschrieben: der erste, das lockere „*tethering*“ der Abwehrzellen an das Endothelium, wird durch die endotheliale Selectin-Familie und ihre Gegenstücke auf den Leukozyten, den Carbohydraten, mediiert. Aufgrund der im Blutfluss auftretenden Scherkräfte imponiert diese lockere Bindung als Rollen (*rolling*) der Leukozyten an der Gefäßwand.

Der zweite Schritt des Adhäsionsvorganges wird auf leukozytärer Seite durch die zuvor erwähnten Integrine, auf endothelialer Seite durch die Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle („ICAM“) ermöglicht. Hierbei resultiert eine feste Bindung. Es müssen jedoch die Integrine zuvor aktiviert werden, was durch die Ausschüttung von Chemokinen erreicht wird.
Die feste Adhäsion der Leukozyten ist für die anschließende Diapedese essentiell und kann erst nach Durchlaufen des ersten, Selectin-mediierten, Schrittes erreicht werden. Eine Aktivierung vor Erreichung des Stadiums des Rollens (*rolling*) führt zu einem Verlust der Migrationsfähigkeit.
Folglich bringt eine intravenöse Injektion von Chemokinen keine Induktion, sondern vielmehr eine Inhibition des Emigrationsprozesses mit sich, da eine generelle frühzeitige Aktivierung der Integrine erfolgt.
Die früher postulierte Hypothese eines sich im Blut befindlichen löslichen Chemokin-Gradienten, der seine Zielzellen zunächst an die Gefäßwand und anschließend durch dieselbige leiten soll, erscheint folglich als falsch: Bei Existenz eines löslichen Gradienten würden die Leukozyten bereits vor Erreichen der Zellwände stimuliert und somit unfähig, in das umgebene Gewebe zu emigrieren. Ein juxtakriner Mechanismus der Präsentation von Chemokinen auf den Endothelmembranen, die sich nahe des entzündeten Gewebes befinden, und der folglich nur auf bereits an der Zellmembran rollende Leukozyten ausgeübte Einfluss der ausgeschütteten Mediatoren erscheint vielmehr sinnvoll und würde die experimentell bewiesene haptochemische Wirkung der Chemokine bestätigen.

ROLLE DER CHEMOKINE BEI DER REKRUTIERUNG VON LEUKOZYTEN

Gemeinsames Charakteristikum von physiologischer Zirkulation naiver Lymphozyten, akuten Entzündungsreaktionen und der Immunantwort zur Bekämpfung eines entarteten Zellverbandes ist die entscheidende Rolle von Chemokinen in dem aus den vier Phasen: „*rolling*“, „*tethering*“, „*firm adhesion*“ und „*diapedesis*“ bestehenden Prozesses der Leukozytenrekrutierung an den Ort des akuten Geschehens. Während für den ersten Schritt des „*rolling*“ -wie beschrieben- die Familie der Selectine, namentlich P- und E-Selectin, unentbehrlich ist und auf den pro-inflammatorischen Effekt von IL-1 hin zur möglichen Interaktion mit leukozytären Kohlenhydratresten auf der Zelloberfläche exprimiert wird, sind für die „*firm adhesion*“ die Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie unverzichtbar.

Integrine sind aus zwei non-covalent gebundenen Untereinheiten bestehende Adhäsionsmoleküle; die freie Kombination verschiedener Untereinheiten kann unterschiedliche Spezifitäten generieren.

Alle Integrine interagieren mit Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie, deren Expression im Verlauf einer Entzündungsreaktion von den involvierten Endothelien hochreguliert wird und somit eine verbesserte Bindung von Leukozyten an das Endothel mit allen daraus resultierenden Konsequenzen wie der Diapedese garantiert. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt beschrieben, ist dazu jedoch die Aktivierung der Leukozyten vonnöten, da die Integrine im Ruhezustand eine zu geringe Affinität zu ihrem Liganden aufweisen. Die Aktivierung kommt durch die Effekte der Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktion zustande und besteht in einer Konformationsänderung der Integrine mit sukzessiver drastischer Affinitätssteigerung (Detmers *et al*., 1990). Zur optimalen Ausübung ihrer Funktion ist, wie oben erwähnt, die Präsentation der Chemokine durch Bindung an die Extrazelluläre Matrix der Endothelzellen, namentlich an Proteoglykane wie Heparansulfat, essentiell. Die Interaktion zwischen Glykosaminoglykan und Chemokin verläuft hierbei Chemokin-C-terminal-vermittelt und ist in ihren Grundzügen bereits beschrieben worden.

Hinsichtlich der Herkunft der so wichtigen chemotaktisch wirksamen Mediatoren lassen sich zwei mögliche Hypothesen darlegen: Einerseits können die Chemokine von den Endothelzellen selbst als Reaktion auf pro-inflammatorische Stimuli produziert und präsentiert werden (Kaplanski *et al*., 1994), andererseits ist eine leukozytäre Herkunft der Chemokine möglich (Middleton *et al*., 2002).

Nach der festen Adhäsion an das Endothel (*firm adhesion*) kann es zum finalen Schritt der Diapedese, der Durchwanderung des Endothels durch Leukozyten, kommen. Auch dieser Prozess ist Chemokin-vermittelt, da die Wanderung der Abwehrzellen entlang des Mediatorkonzentrationsgradienten erfolgt. Die folgende Abbildung soll die gesamten ablaufenden Prozesse verdeutlichen:

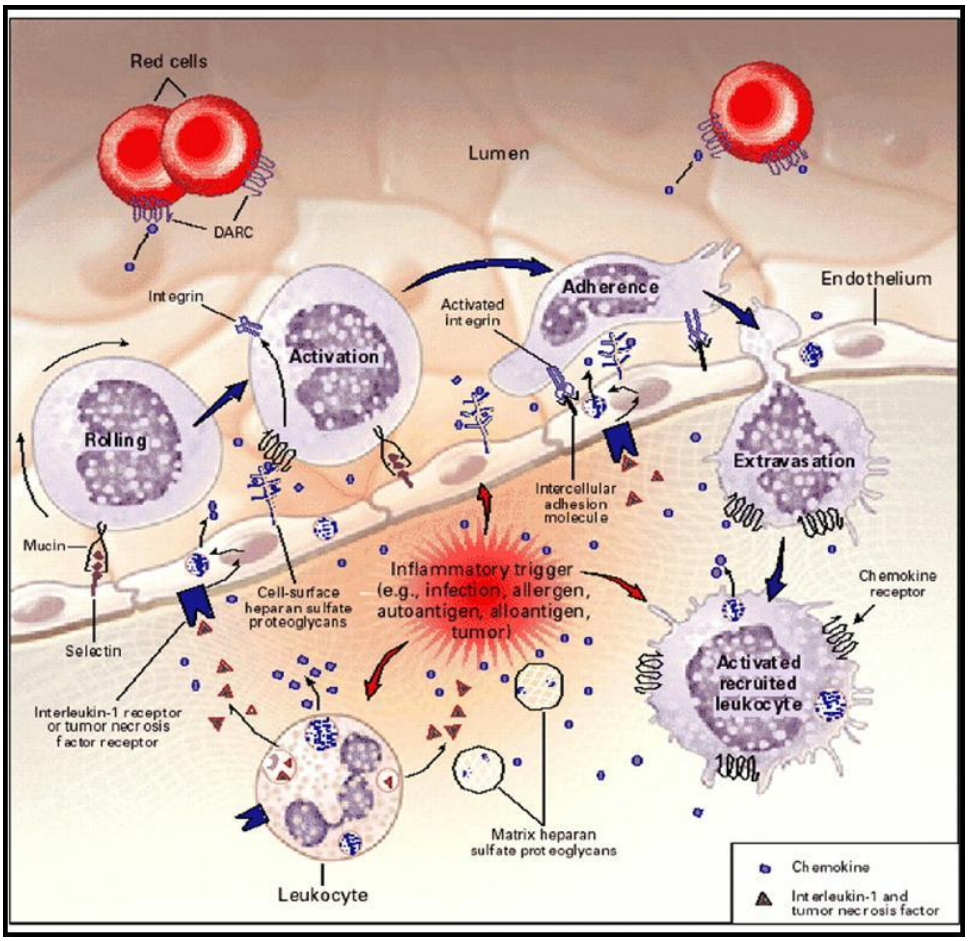


Abb.5: Chemokin-vermittelte Regulation der Leukozytenmigration. Chemokine werden in Gebieten von Entzündungsvorgängen von ortsständigen Gewebezellen oder Cytokin-aktivierten Endothelien sezerniert. Chemokine werden lokal an die Zellmatrix und Proteoglykane gebunden. Dies erzeugt einen Chemokin-Konzentrationsgradienten im Umkreis des inflammatorischen Stimulus. Leukozyten, die bisher selectin-vermittelt locker auf dem Endothelium rollten, kommen so mit den gebundenen Chemokinen in Kontakt. Deren rezeptorvermittelte Wirkung aktiviert leukozytäre Integrine, was zu den Prozssen der festen Endotheladhäsion und Extravasion führt. (Aus: Luster, A.D., Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436-445. Mit freundlicher Genehmigung des *New England Journal of Medicine*).

ROLLE DER CHEMOKINE IN DER TUMORIGENESE (INCL. ANGIOGENESE)

Aufgrund der induzierenden Wirkung auf die Zellmigration sollen Chemokine eine Teilhabe an der Entstehung von malignen Tumoren haben, da eine prolongierte Entzündungsreaktion günstige Voraussetzungen für eine mögliche Carcinogenese bieten soll. Andererseits stellen gerade die Leukozytenrekrutierung und die damit verbundene immunologische Auseinandersetzung des Organismus mit dem entarteten Zellklon wichtige Bedingungen für die Prozesse der Tumorimmunüberwachung dar. Beide Konzepte wurden mittlerweile in der Hypothese der Tumorimmuneditierung verschmolzen, die von drei unterschiedlichen Komponenten der gesamten Tumor-Immunsystem-Interaktion ausgeht (siehe oben).

Chemokine beeinflussen darüber hinaus durch ihre Effekte auf die Angiogenese, Tumor-Leukozyt-Interaktion, Invasion und Metastasierung weitere wichtige Variable. Ihre Rolle ist dabei aufgrund verschiedener Wirkungen unterschiedlicher Chemokine komplex, da einige Vertreter z.B. die für die Tumorigenese wichtige Angiogenese fördern, andere hingegen einen angiostatischen und damit tumorinhibitorischen Effekt ausüben.

Allgemein gesprochen wird der Prozess der Angiogenese durch die Neubildung von Blutgefässen gekennzeichnet. Dies ist für viele verschiedene physiologische Prozesse wie die Embryonalentwicklung und Wundheilung, aber auch einige pathologische Vorgänge (chronische Entzündungen, Wachstum von malignen Tumoren) von Bedeutung. Im Hinblick auf die Angiogenese werden die Chemokine in zwei Gruppen unterteilt. Die Einteilung richtet sich nach dem Vorhandensein oder Fehlen eines sogenannten „ELR“-Motivs. Hierbei handelt es sich um ein Motiv von drei N-terminalen Aminosäuren (Glu-Leu-Arg), die in der Primärstruktur vor dem ersten Cysteinrest dieser Chemokine vorkommen (Romagnani *et al*., 2004).

Diejenigen Chemokine, die dieses Motiv besitzen, üben eine proangiogenetische Wirkung aus (z.B. CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 [GCP-2], CXCL8 [IL-8]), diejenigen, die es nicht besitzen, im Gegenteil eine angiostatische (z.B. CXCL9 [MIG], CXCL10, CXCL11, PF4). Für die angiogenetische bzw. -statische Wirkung der Chemokine werden sowohl Rezeptor-abhängige als auch Rezeptor-unabhängige Mechanismen postuliert: CXCL10 z.B. soll – neben den Signalwegen, die durch die Bindung an eine Spleißvariante seines Reptors (CXCR3-B) vermitteltet werden- auch über die direkte Interaktion (Bindung. Verhinderung der Formierung von Homodimeren) mit Wachstumfaktoren (bFGF-2, VEGF) die Angiogenese hemmen (Romagnani *et al*., 2004).

Da die Bildung neuer Blutgefäße für den wachsenden Tumor aufgrund des erhöhten Sauer- sowie Nährstoffbedarfs essentiell ist und gleichzeitig eine Fernmetastasierung stimulieren kann, ist eine anti-tumoröse Wirkung ELR-negativer Chemokine denkbar. In der Tat konnten Arenberg *et al*. eine Inhibition des Tumorwachstums von nicht-kleinzelligen Lungencarcinomen durch CXCL10 zeigen (Arenberg *et al*., 1996).

Davon abgesehen spielt auch die Art der rekrutierten Leukozyten eine Rolle in der Tumorigenese: Neutrophile Granulozyten und Makrophagen sollen durch Ausschüttung von die Zellmatrix verdauenden Enzymen die Zellaussaat fördern (Mantovani *et al*., 2004; Opdenakker *et al*., 2004), während NK- und zytotoxische T-Zellen eine antitumorale Wirkung entfalten (Wallace *et al*., 2005).

Abbildung 6 zeigt alle in der Tumorigenese durch Chemokine mediierten Vorgänge.

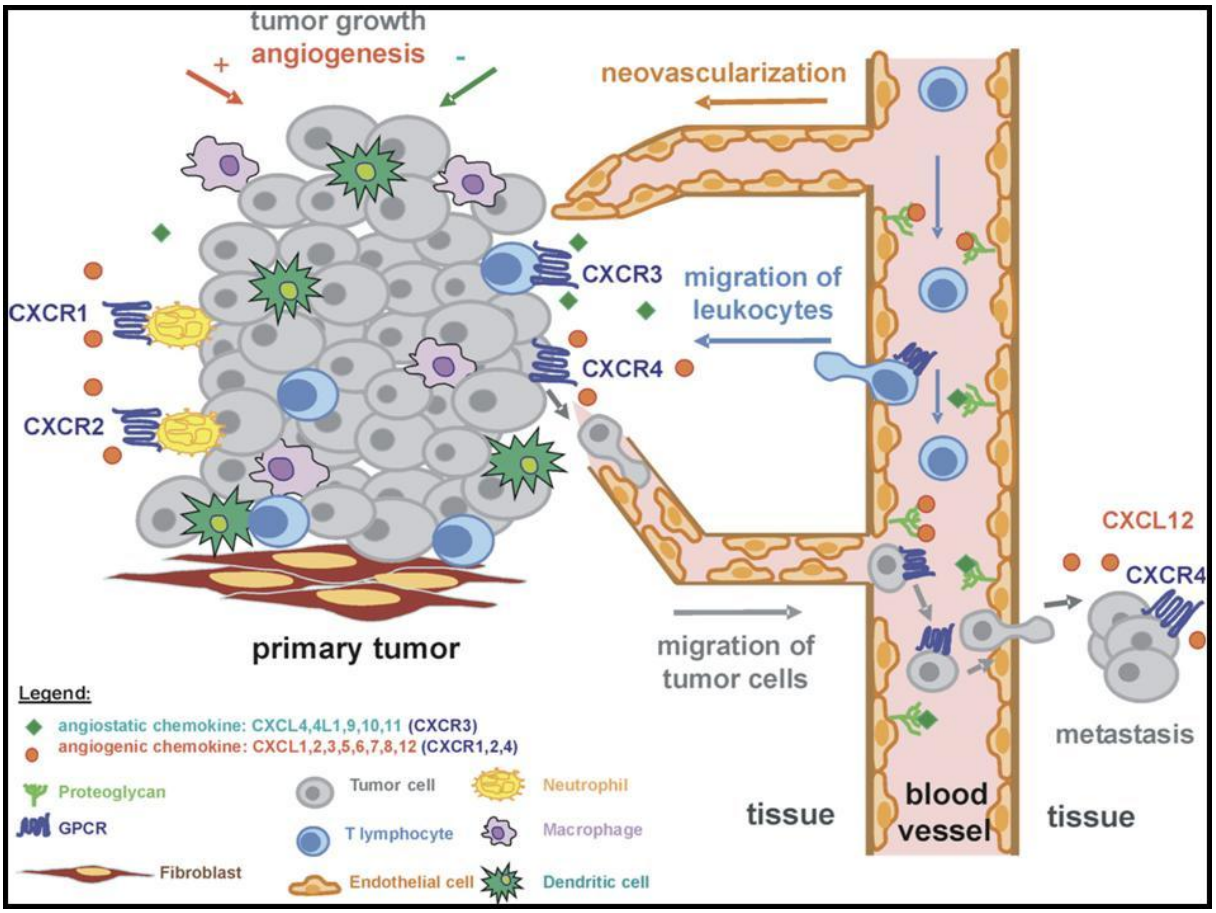


Abb.6: Rolle der Chemokine und ihrer Rezeptoren im Tumormilieu. Solide Tumore enthalten verschiedene Typen von Stromazellen, wie z.B. Fibroblasten oder Endothelzellen. All diese Zellen sind in der Lage, Chemokine zu sezernieren und somit die Migration von Leukozyten zu regulieren. Diese stellt einen hochgradig koordinierten mehrstufigen Prozess dar, der über die Stadien des Rollens am Endothelium und der Chemokin-vermittelten festen Adhäsion in den Mediatorgradienten-abhängigen Vorgang der Diapedese ins Interstitium mündet. Der Tumor wird so von Neutrophilen, T-Lymphozyten, und dendritischen Zellen infiltriert. ELR+ CXC Chemokine locken dabei CXCR2 exprimierende pro-tumorale Neutrophile an, die durch ihre Proteasen Gewebe zerstören und die Tumorausbreitung erleichtern können. Im Gegensatz dazu locken einige ELR negative CXC Chemokine, wie die CXCR3 Liganden CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC, aktivierte CXCR3 T Lymphozyten und NK Zellen an, die eine tumorbekämpfende, zytotoxische Wirkung ausüben. Die Produktion von Chemokinen hat zusätzlich einen Einfluss auf die Vorgänge der Angiogenese (durch die CXCR2 Liganden CXCL1,2,3/GRO-,a,b,c CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/ NAP-2, CXCL8/IL-8 und den CXCR4 Agonisten CXCL12/SDF vermittelt) oder Angiostase (CXCL4/PF-4, CXCL4L1/PF-4var, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC). Die Bildung neuer Blutgefäße ist für den wachsenden Tumor aufgrund des Bedarfs an Sauer- und Nährstoffen von großer Bedeutung und stimuliert gleichzeitig die Metastasierung. Die CXCR4-CXCL12/SDF-1 Rezeptor–Liganden Achse ist dazu an der direkten Migration verschleppter Tumorzellen beteiligt. (Aus: Vandercappellen *et al*., The role of CXC chemokines and their receptors in cancer, *Cancer Letters*, 2008. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Ltd).

CXCL10 / IP 10 / „INTERFERON-GAMMA INDUCIBLE PROTEIN OF 10 KDA“

IP 10 steht als Abkürzung für ein kleines Protein von einer ungefähren Größe von 10 kDa (8,7 kDa), das von verschiedenen humanen Zellarten, wie z.B. Endothelien, Monozyten,

Fibroblasten und Keratinozyten sezerniert werden kann (Luster *et al*., 1987). Aufgrund seiner Aminosäurestruktur kann es der Gruppe der CXC-Chemokine (α-Chemokine) zugeordnet werden. Es handelt sich hierbei um ein durch Entzündungssignale wie Interferone (IFN) höchstgradig induzierbares Gen, das in einigen Geweben (Leber, Milz, Niere) jedoch auch konstitutiv exprimiert wird (Liang *et al*., 1994; Wang *et al*., 1996; Gattass *et al*., 1994).

Bezüglich seiner biologischen Wirkungen kann man es als Modulator der TH1-Typ Immunantwort mit Wirkungen auf die Chemotaxis von T-Lymphozyten, Monozyten, Natürlichen Killer (NK-) Zellen und auch neutrophilen Granulozyten beschrieben. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass die chemotaktischen Effekte nur auf aktivierte Leukozyten ausgeübt werden (Roth *et al.*, 1995; Loetscher *et al*., 1996).

Des Weiteren besteht eine Hauptrolle des Chemokins in der Regulation der T-Zell-Adhäsion und Emigration vom vaskulären Kompartiment in den Bereich einer floriden Entzündung mittels spezifischer endothelialer Liganden wie Integrinen und Selektinen und Komponenten der extrazellulären Matrix (Taub *et al*.,1993; Lloyd *et al*.,1996), ebenso sind eine Verstärkung der NK- (*natural killer*) Zellen- Aktivität (Pobertson und Ritz, 1990) als auch eine anti-angiogenetische Aktivität (Strieter *et al*.,1995; Angiolillo *et al*.,1995) beschrieben worden. CXCL10 soll hierbei die Interaktion von VEGF sowie bFGF mit dem jeweiligen Rezeptor durch Störung der GAG-Bindung behindern und damit auch konsekutiv die notwendige Dimerisierung verhindern (Luster *et al*., 1995; Perollet *et al*., 1998).

Besonderes Augenmerk soll an dieser Stelle auf die anti-tumoröse Potenz des Proteins gerichtet werden. IP10 oder auch CXCL10 kann durch Rekrutierung aktivierter Monozyten, T-Lymphozyten und polymorphkerniger Zellen das Tumorwachstum muriner mammärer Adenocarcinome sowie von Plasmozytomen signifikant eindämmen (Luster und Leder, 1993).

Neuere Arbeiten zeigten einen supprimierenden Effekt von IP10/CXCL10 auf Hämangiosarkome (Giese *et al*., 2002). Alle Effekte werden durch die Interaktion mit dem Rezeptor CXCR3 erzielt. Dieser bindet neben seinem Hauptliganden ebenfalls CXCL9 und CXCL11 und findet sich auf Monozyten, TH1-, glatten Muskel- und mesangialen Zellen.

Es existieren mindestens drei Varianten von CXCR3, die durch alternatives Splicen entstehen und CXCR3-A, CXCR3-B und CXCR3-alt genannt werden (Strieter *et al*., 2005). CXCR3-A spielt in den Prozessen der Rekrutierung von NK- und aktivierten T-Lymphozyten eine Rolle und ist damit mit anti-tumoralen Wirkungen verknüpft (Luster *et al*., 1993; Wenzel *et al*., 2005).

Für CXCR3-B wird die angiostatische Wirkung CXCL10s postuliert (Lasagni *et al*., 2003; Yang *et al*., 2004).

Die Expression beider Rezeptoren auf der Zelloberfläche variiert zwischen den verschiedenen Gewebetypen wie Leber, Herz, Niere (Expression beider Rezptortypen) einer- und Placenta

(nur CXCR3-A) und mikrovaskulären Endothelzellen (nur CXCR3-B) andererseits und ist dabei vom Zellzyklus abhängig und auf die S/G2-M Phase limitiert (Romagnani *et al*., 2001).

Die physiologische Rolle der Variante CXCR3-alt ist noch nicht abschließend geklärt.

DIE STRUKTUR VON IP10 / CXCL10

Alle Mitglieder der α- und β-Chemokin-Familie bestehen aus einer Polypeptid-Kette einer Größe von ungefähr 8-10 kDa, die hinsichtlich ihrer Struktur eine Übereinstimmung von 25% bis 70% zeigt.

IP10 besteht aus 78 Aminosäuren und besitzt in der sezernierten Form ein molekulares Gewicht von 8,7 kDa. Die Primärstruktur lautet nach Power und Wells (1996):

VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFFCPRVEJJATMKKKGEKRCL NPESKAIKNLLKAVSKEMSKRSP

Die Anzahl basischer Aminosäuren der Primärstruktur sorgt dafür, dass sich das Gesamtprotein wie ein hochgradig basisches Polypeptid verhält. Dies könnte die hohe Bindungsaffinität zu den negativ geladenen Gefäßendothelien allgemein und den sauren Glycosaminoglykanen im Besonderen erklären.

SEKUNDÄRSTRUKTUR

Die Primärstruktur jedes Chemokins enthält vier Cysteinyl-Reste, die sich in hochgradig konservierten Positionen befinden. Dieses Merkmal wurde in der Vergangenheit für die Identifikation und Definition der einzelnen Chemokin-Klassen genutzt: Die ß-Familie zeichnet sich durch das direkte Aufeinanderfolgen der ersten beiden Cysteinyl-Reste aus, während in der α-, oder auch C-X-C-, Familie eine Aminosäure diese beiden trennt. Die physiologische Rolle der Cysteinyl-Reste ist nicht zu unterschätzen; sorgen doch die Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten sowie dem zweiten und vierten Rest für eine charakteristische Schleifenstruktur, die für die in vivo Funktionalität des gesamten Proteins von enormer Bedeutung ist: Dies zeigt sich daran, dass durch Zugeben reduzierender Agenzien wie ß-Mercaptoethanol die biologische Aktivität des Chemokins völlig aufgehoben werden kann.

In der Familie der CXC-Chemokine spielt des Weiteren noch die Unterscheidung in ELR-Motiv-positive oder -negative Proteine eine Rolle, wobei CXCL10 zur letzteren Gruppe gehört.

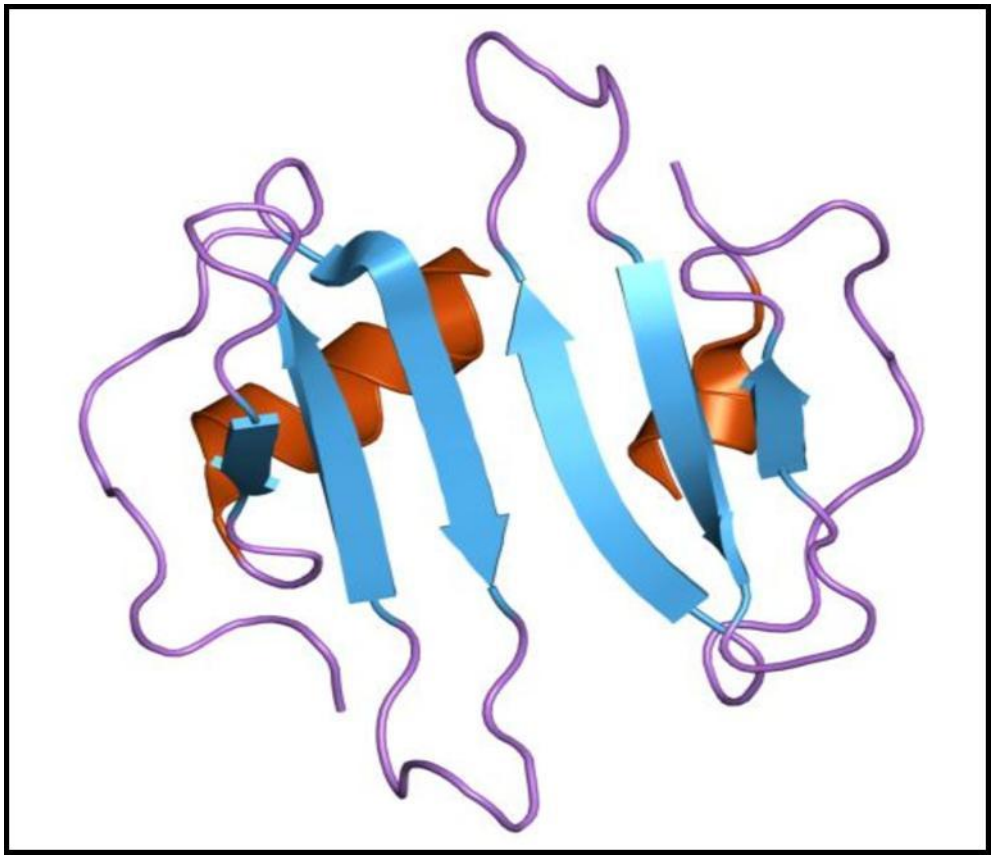


Abb.7: Sekundärstruktur von CXCL10

BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON IP10 / CXCL10

Das zentrale Ereignis einer inflammatorischen Antwort eines Organismus liegt in der Emigration von Leukozyten aus dem Blut und deren Akkumulation im entzündeten Gewebe. Während dieses Prozesses adhärieren die Abwehrzellen zunächst am Endothelium postkapillärer Venolen und kleiner Venen, migrieren anschließend durch die Zellschicht und die angrenzende Basalmembran und bewegen sich schließlich im Gewebe bis zum Fokus des Entzündungsgeschehens. Während dabei die Vorgänge der Adhäsion strikt durch das genaue Zusammenspiel verschiedener Rezeptor-Ligand-Paare von Zelladhäsionsmolekülen zwischen Leukozyt und Zellmembran geregelt werden, wird für die transendotheliale Migration ein entscheidender Einfluss verschiedener chemoattraktiver Botenstoffe angenommen. Neben den klassischen Vertretern dieser Gruppe wie dem Komplementfaktor C5a oder bakteriellen Peptiden spielt auch die Gruppe der chemoattraktiven Cytokine, auch Chemokine genannt, eine Rolle: In Kontrast zu allen anderen klassischen Botenstoffen, die auf alle Arten von Leukozyten wirken, zeigen die Chemokine eine scharf begrenzte Zellspezifität: Das pro-inflammatorische Chemokin „RANTES“ z.B. entfaltet seine Wirkung nur auf Eosino- und Basophile, T-Lympho- sowie Monozyten, während Neutrophile nicht durch die Ausschüttung des Proteins beeinflusst werden. CXCL10 dagegen erweist sich als besonders wirksam in der

Rekrutierung von TH1-Leukozyten sowie NK- (*natural killer*) Zellen, was auch durch die Proteinstruktur mit Fehlen des ELR-Aminosäuremotivs unterstützt wird. Folglich ist das Protein mit Anti-Tumor- und angiostatischen Effekten assoziiert.

FRACTALKINE (CX3CL1)

CX3CL1 oder Fractalkine ist einzigartig: Es ist bis zum heutigen Tage der einzige Vertreter der Gruppe der CX3C-Chemokine und unterscheidet sich aufgrund seiner Struktur deutlich von den ansonsten bekannten chemoattraktiven Cytokinen. Neben der aus 76 Aminosäuren bestehenden Chemokin-Domäne, die bezüglich der die Gruppenzugehörigkeit determinierenden Komposition der Cysteinyl-Reste die einzigartige Anordnung CXXXC besitzt, fällt eine sich daran anschließende, Mucin-artige Domäne auf, die in ähnlicher Form sonst nur bei CXCL16, dem sogenannten „Bonzo- Liganden“ gefunden werden kann. Diese Domäne besteht in Form eines langen Stiels aus 241 Aminosäuren und ist hochgradig glykolysiert. Des Weiteren finden sich eine transmembranöse und eine intrazelluläre Region mit 37 Aminosäuren (Bazan *et al*., 1997; Pan *et al*., 1997).

Die Expression des Proteins kann durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Interleukin-1 (IL-1) und Interferon-γ (IFN-γ) signifikant induziert werden (Bazan *et al.*, 1997).

Auffällig ist hierbei die fast völlig fehlende Expression des Proteins durch Leukozyten; sie wird fast zum kompletten Prozentsatz von Endothelzellen übernommen.

Neben einer –wie für ein entzündungsförderndes Chemokin zu erwartenden und über einen spezifischen Rezeptor der Gruppe der Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen namens CX3CL1 (ebenfalls 1997 entdeckt) vermittelten– chemotaktischen Wirkung auf Monozyten, Natürliche Killer (NK-) und T-Zellen ist eine weitere Eigenschaft von besonderem Interesse: Wie allseits bekannt regulieren Chemokine in Zusammenarbeit mit diversen Adhäsionsmolekülen der endothelialen Zellmembran die Prozesse der korrekten Zirkulation der verschiedenen Leukozytensubtypen zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten des Körpers (Kunkel und Butcher, 2002). Dabei spielt für den ersten Schritt der Leukozytenmigration in das Gewebe die Interaktion zwischen den am Rande des Blutstroms rollenden weißen Blutkörperchen und dem Selectinbesatz des Endothels eine wichtige Rolle. Diese Interaktion führt zu einer ersten Bindung, die durch die Chemokin-vermittelte Aktivierung von Integrinen auf den Leukozyten in eine feste übergeht (*firm adhesion*) und so letztlich zu einer Extravasation durch das Endothel in das umgebende Bindegewebe führt (Cines *et al*., 1998; Middleton *et al*., 2002; Moser und Loetscher, 2001; Worthylake und Burridge, 2001).

Die Diapedese ist dabei von dem Integrinbesatz der Endothelzellen und der Präsentation der lokal produzierten Chemokine durch Glykoysaminoglykane abhängig.

Im Falle von Fractalkine hingegen wird das Chemokin direkt am Ende der membrangebundenen, Mucin-artigen Domäne gebunden und so den Leukozyten präsentiert. Dabei wirkt es selbst als Adhäsionsmolekül (Imai *et al*., 1997), was den gesamten nachfolgenden Prozess der Zellrekrutierung unabhängig von einer wie auch immer gearteten Interaktion mit Proteoglykanen oder anderen Adhäsionsmolekülen macht (Umehara et al., 2001).

Dies konnte auch in einem eleganten *in vitro* Versuch demonstriert werden, der im Folgenden kurz skizziert werden soll: In der Versuchsanordnung wurde die Chemokindomäne des Proteins gegen das CC-Chemokin TARC /CCL 17 ausgetauscht und das neue Konstrukt auf einer Glasplatte immobilisiert. Nur Zellen mit dem für TARC passenden Rezeptor (CCR4) waren im Anschluss daran in der Lage, fest an das veränderte Fractalkine zu binden; die Selektivität der Interaktion hing also von der Chemokindomäne ab.

Veränderte man darauf in einem zweiten Schritt das Konstrukt durch Deletion des Mucin-artigen Anteils, waren keine Zellen mehr zur Bindung befähigt. Dies wurde als Beweis der Abhängigkeit der Adhäsion von dem Zusammenspiel zwischen Zelle und Mucindomäne des Chemokins gewertet. (Imai *et al*., 1997)

Auch unter physiologischen Bedingungen mit entsprechenden Flussraten und daraus resultierenden Scherkräften kann die alleinige Präsentation von Fractalkine auf der Zelloberfläche eine feste Bindung vermitteln; die wichtigsten Unterschiede zwischen dem klassischen und in Gegensatz dazu durch Fractalkine vermittelten Rekrutierungsvorgang soll Abbildung 8 verdeutlichen:

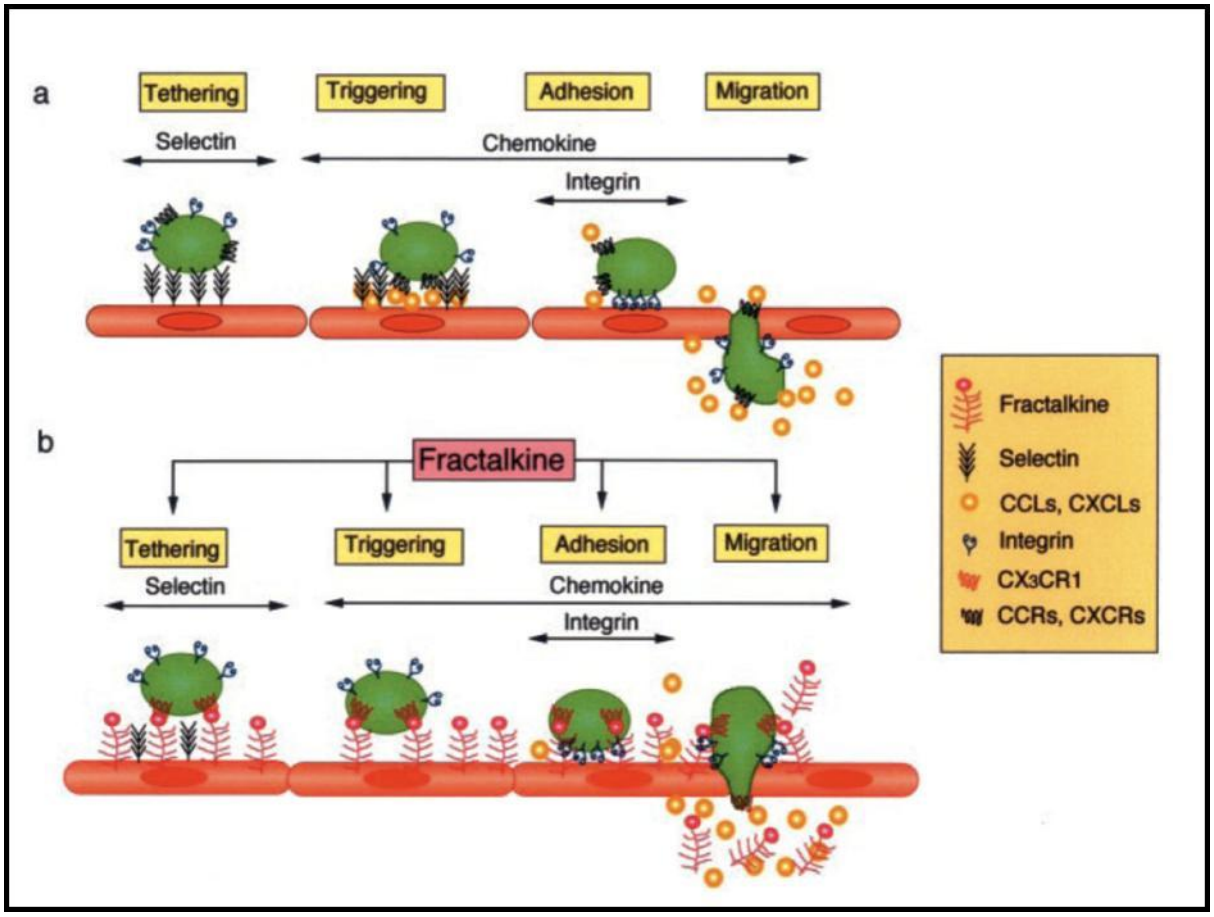


Abb.8: Schematische Darstellung der Prozesse bei der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom. a) klassische Abfolge: Selectine, die auf dem Endothel exprimiert werden, fangen die Leukozyten ein. Anschließend werden durch auf dem Endothel immobilisierte Chemokine die Integrine der Leukozyten aktiviert und binden an Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie auf den Endothelzellen. Die folgende Diapedese durch das Endothel wird ebenso durch Chemokine koordiniert. **b)** Schema unter der Berücksichtigung der Fähigkeiten des CX3CL1-Moleküls und des zugehörigen Rezeptors auf den Leukozyten. CX3CL1 im Zusammenspiel mit dem Rezeptor CX3CR1 kann alle Schritte der Rekrutierung ohne weitere Adhäsionsmoleküle oder Chemokine koordinieren. (Abbildung modifiziert nach Umehara *et al.*, 2004).

GLYKOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL - ANKER (GPI-ANKER)

Der Umstand, dass viele Proteine durch eine kovalente Bindung mit Lipiden an der Oberfläche der Zellmembran präsentiert werden können, ist seit den 70er Jahren allgemein bekannt. Als mögliche Bindungspartner sind dabei Fettsäuren (Schmidt *et al.*, 1979), Isoprenoide (Glomset *et al.*, 1990), Diacylglycerole (Hantke und Braun, 1973) und Glycosylphosphatidylinositole (GPI) (Ferguson *et al.*, 1985) beschrieben worden, wobei sich diese aufgrund ihrer einzigartigen Struktur aus Ethanolaminphosphat, Trimannosid, Glucosamin und Inositolphospholipid von den anderen abheben (Ferguson und Williams, 1988).

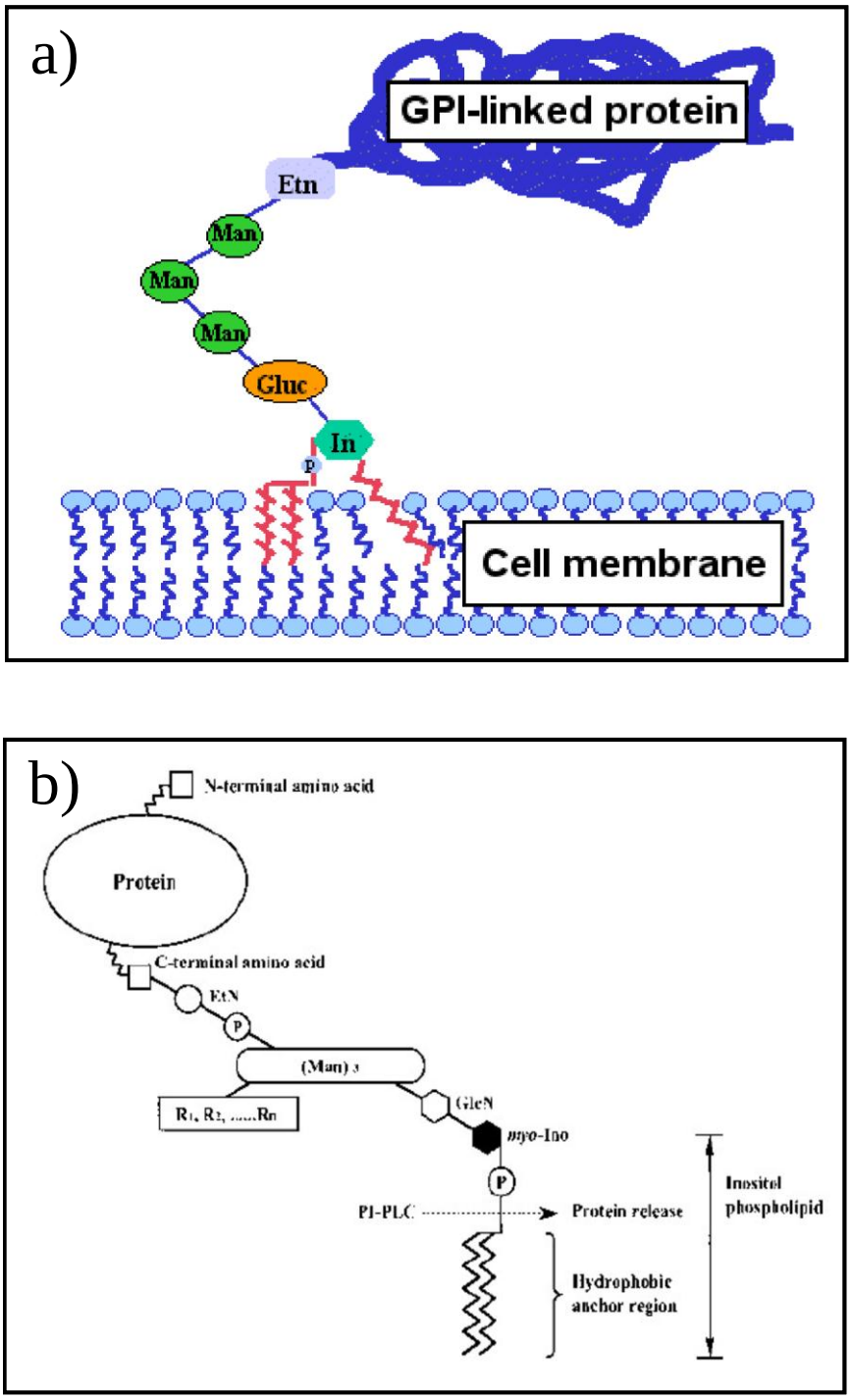


Abb.9: Schematische Darstellungen der Struktur eines Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankers.
a) und b) GPI-Anker sind amphiphatische Strukturen, die aus einer Phosphatidylinositol-Kopfgruppe, verschiedenen Kohlenhydratresten und Phosphoethanolamin bestehen. Sie sind mit dem C-Terminus des jeweiligen Proteins verbunden und verankern selbiges durch die hydrophoben Fettsäuren des Phospholipids in der äußeren Schicht der Lipiddoppelmembran. (Mit freundlicher Genehmigung von Ikezawa , 2002)

GPI-Anker werden posttranslational an die jeweiligen Proteine angefügt. Sie bestehen prinzipiell aus einem über drei Mannose- und ein Glukosamin-Molekül glykosidisch mit Phosphatidylinositol verbundenen Phosphoethanolaminrest. Durch das Phospholipid erfolgt

die Verankerung in der Zellmembran, welche häufig an Cholesterol- und Sphingolipidreichen Mikrodomänen, den sogenannten „*lipid rafts*“, erfolgt. Diese Tatsache birgt das Problem der erschwerten Isolation in sich, da man zur schonenden Lösung des verankerten Proteins auf schwache Detergentien angewiesen ist. Diese können allerdings die „*lipid rafts“* nur mit Schwierigkeiten solubilisieren (Sevlever *et al*., 1999).
GPI-verankerte Proteine sind ubiquitär verbreitet (z.B. Alkalische Phosphatase, *decay accelerating factor*). Die Präsentation des zu verankernden Proteins geschieht über eine kovalente Bindung des C-Terminus des Proteins mit einem Ethanolamin des Ankers, welcher sich auch nach Isolierung in Zellmembranen reinkorporieren lässt (Medof *et al*., 1996) und dabei dem gekoppelten Protein die volle Funktionalität erlaubt (Premkumar *et al*., 2001).
Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden ist es möglich geworden, heutzutage fast jedes beliebige Protein mit einem GPI-Anker zu versehen. Dieser Vorgang ist unter den Synonymen „*cell painting*“ oder „*cell surface engineering*“ bekannt geworden, da er den willkürlichen Besatz von Zellmembranen mit Oberflächenmolekülen ermöglicht. Auf diese Weise kann man Zellen oder Gewebe nach persönlichen Interessen unter Umgehung einer Veränderung der DNA-Information gestalten. Gerade die verhinderte Manipulation des Erbguts der Zielzelle macht diese Methode für wissenschaftliche Zwecke sehr interessant. Hinzu kommt die Einfachheit des Prozesses, den man schon in der Vergangenheit in Experimenten zur Entwicklung neuer Angriffspunkte in der Tumorbehandlung benutzt hat: Li *et al.* koppelten 2004 IL-2 und IL-12 mit dem Membrananker und fixierten das Konstrukt auf Tumorzellen, Cimino *et al*. verfolgten in demselben Jahr einen Ansatz über die Verwendung des die Effektor-Leukozyten aktivierenden co-stimulatorischen Moleküls B7.1.
Der Grundgedanke dieses Projekts soll im folgenden Abschnitt kurz dargelegt werden:

FRAGESTELLUNG UND DAS ZIEL DER ARBEIT

HINTERGRUND

Um die Funktion des Gesamtorganismus zu gewährleisten, muss die einzelne Zelle ihre Wachstumsvorgänge, ihre Differenzierung, ihre Beziehung zu Nachbarzellen und auch ihren Verbleib im Gewebsverband unter Kontrolle haben. Dafür existiert eine Reihe von Genen, die diese Vorgänge regulieren. Es handelt sich hierbei im Wesentlichen um Gene, welche die Integrität des Genoms überwachen oder Vorgänge wie Neubildung, Ausreifung und Absterben kontrollieren. Wenn sechs dieser Gene verändert sind, ohne repariert worden zu sein, kann die einzelne Zelle zu einer Tumorzelle entarten. An ihrer Entstehung sind zahlreiche Faktoren beteiligt, die auch bei der Embryogenese und der Regeneration Proliferations- und Differenzierungsvorgänge steuern. Folglich bringt eine Störung im diffizilen Zusammenspiel dieser Vorgänge folgende, allen Tumorzellen gemeinsame zellbiologischen Störungen hervor: Verlust der Genom-Integrität, Störung der Apoptose, Angioneogenese, Invasion und Metastasierung bei überschießender Wachstumsstimulation,

fehlendes Ansprechen auf wachstuminhibitorisch wirksame Stimuli und schließlich eine Störung der Tumorimmunologie. Letzteres dient dem Entkommen der körpereigenen Tumorkontrolle und liegt einerseits an Faktoren wie der mangelnden Immunogenität der neugebildeten Tumorantigene, tumoröser Expression des Fas-Liganden mit konsekutiver Apoptose des spezifischen anti-tumoreffektiven T-Zell Klons, andererseits aber auch an der aktiven Sezernierung inhibitorischer Zytokine wie IL-10, was die Aktivierung und Differenzierung CD4-positiver T-Zellen unterdrückt (Leen *et al*., 2007).

Ein Ungleichgewicht von immunsupprimierenden und –aktivierenden Chemokinen wird im Serum vieler Tumorpatienten gefunden (Shurin *et al*., 1999; Moss *et al*., 2004). In der Pleuraflüssigkeit von NSCLC-Patienten werden immunsupprimierende Interleukine wie zum Beispiel IL-4, IL-10 oder TGF-β1 in wesentlich höherem Maße als ihre proinflammatorischen Gegenspieler IL-2 oder IL-8 gefunden (Li *et al*., 2003).

All diese Faktoren führen zum Versagen des körpereigenen Tumorüberwachungssystem zytotoxischer CD8-Zellen oder NK- (*natural killer*) Zellen und ermöglichen den malignen transformierten Zellen weiteres Wachstum. Andererseits könnte durch das tumorspezifische Umfeld ein Milieu erzeugt werden, das aufgrund des immunologischen Druckes Mutationen und die Selektion möglichst resistenter Tumorklone fördert.

Die Bedeutung der körpereigenen Tumorabwehr wird besonders durch Studien an transplantierten und folglich -iatrogen gewünscht- immunsupprimierten Patienten hervorgehoben: Ein transplantiertes Kollektiv zeigte eine drei- bis fünffach höhere Inzidenz an epithelialen Tumoren wie z.B. colorektales, Bronchial- oder Prostata-Ca, wobei die Inzidenz mit dem laufendem Beobachtungszeitraum linear korrelierte (Buell *et al.*, 2005).

Versuche der immunologischen Tumortherapie, mittels tumorspezifischer T-Zellen eine stärkere und somit effektivere Entzündungsreaktion des Organismus gegen die entarteten Zellen herbeizuführen, scheiterten nicht zuletzt auch an der unzureichenden Infiltration des malignen Gewebes (Okada, 2005).

Die vorliegende Arbeit möchte die proinflammatorisch-chemotaktische Aktivität von CXCL10 unter dem Gesichtspunkt eines möglichen Nutzens des modifizierten Proteins im Rahmen einer adjuvanten Therapie bestimmter maligner Erkrankungen betrachten.

Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass es sich um ein artifiziell hergestelltes Konstrukt handelt, das alle Vorstellungen des „Oberflächen-*Engineering*“ erfüllt: Die funktionelle Domäne eines Chemokin-Analogons wird auf der Zelloberfläche in einer definierten Konzentration mithilfe eines GPI-Membranankers fixiert.

Grundsätzlich sollte das mit einem GPI-Anker versehene Protein –lokal an die Stelle entarteter Zellen injiziert– durch die Erzeugung eines räumlich beschränkt vorhandenen Gradienten in der Lage sein, Effektor-T-Zellen in die Tumorregion zu locken und somit die natürliche biologische Körperabwehr gegen maligne entartete Zellen zu unterstützen.

Das für den Prozess der Leukozytenrekrutierung notwendige co-stimulatorische Signal der Hochregulierung verschiedener endothelialer Adhäsionsmoleküle wird hierbei jedoch spezifisch durch die an das CXCL10 gekoppelte Mucin-artige Domäne geliefert. Die vom Chemokin Fractalkine gewonnene Domäne ermöglicht eine vom Rezeptorenbesatz der Endothel- und Abwehrzellen unabhängige Adhäsion und Diapedese ins Interstitium, in welchem die Anti-Tumor-Aktivität der körpereigenen Zellen zum Tragen kommt.

Die folgende Abbildung soll das Konzept der von Co-Stimuli unabhängigen Präsentation von Chemokinen noch einmal zusammenfassen:

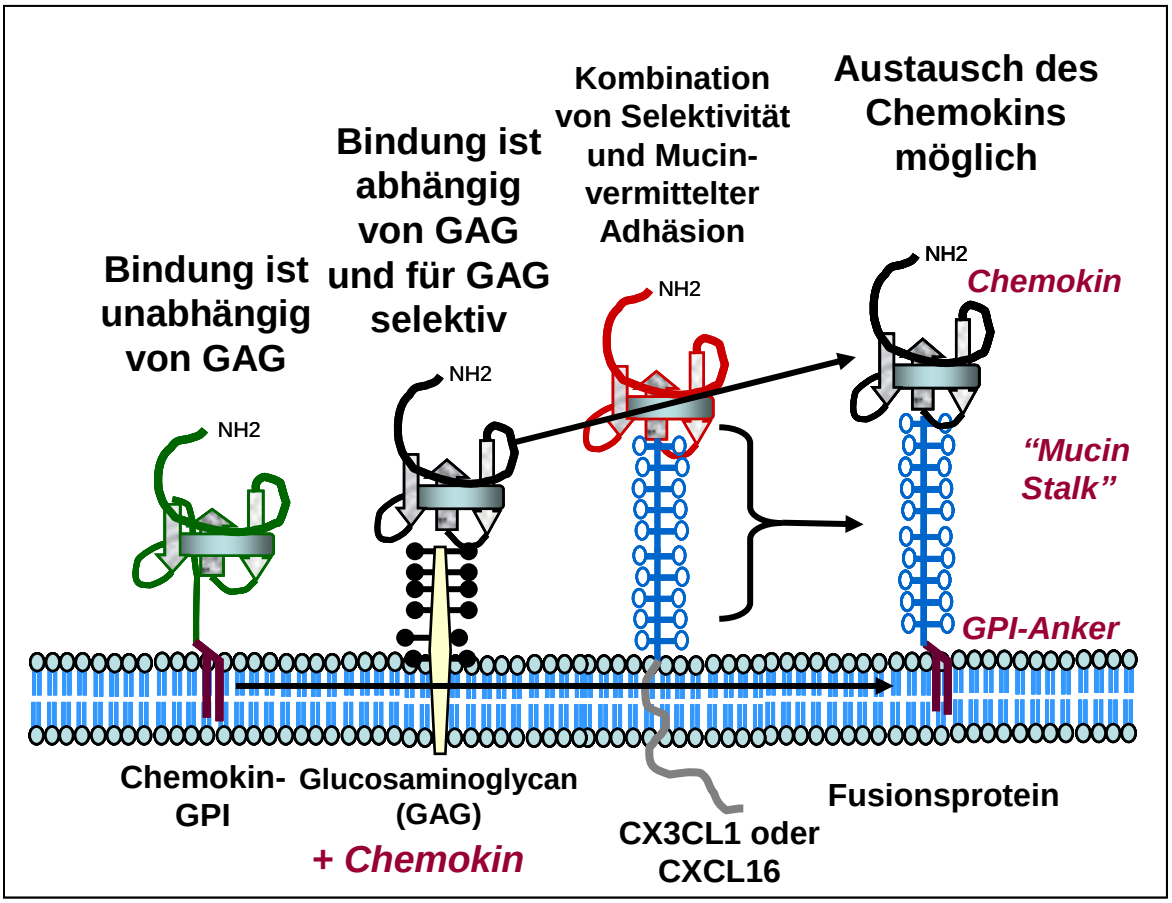


Abb.10: Möglichkeiten der Präsentation von Chemokinen auf der Zelloberfläche. Während normalerweise die Präsentation eines Chemokins an der Zellmembran von der Interaktion mit Glykosaminoglykanen (GAG) abhängt (zweites Szenario von links), gelingt es, sich durch die Bindung des Mediators an einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker vom Besatz der Zelle mit GAG zu emanzipieren (ganz links). Durch Einführung der Mucin-ähnlichen Domäne des Chemokins „Fractalkine/CX3CL1" gelingt es, die Adhäsion der Leukozyten unabhängig von ansonst notwendigen adhäsionsvermittelnden Faktoren wie Integrinen zu erreichen. Dieses Konzept ermöglicht alle Chancen des sogenannten „*cell paintings*". (Mit freundlicher Genehmigung von Peter J. Nelson, München)

ZIELE DER ARBEIT

Zuvorderste Aufgabe der Bemühungen war es, das zuvor beschriebene Fusionsprotein CXCL10-GPI sowie dessen Erweiterung mucin CXCL10-GPI herzustellen, stabil exprimieren und schließlich proteinchemisch in einem ausreichenden Reinheitsgrad isolieren zu können. Zur Herstellung der Konstrukte mussten die DNA-Sequenzen von CXCL10 und des „*mucin-like stalks*“ Fractalkines aus einem Plasmid (CXCL10) bzw. einer cDNA-Probe (Mucindomäne) amplifiziert, in einem zweiten Schritt zusammen mit der Sequenz des GPI-Membranankers in einen Vektor kloniert, anschließend möglichst stabil transfiziert und an der Oberfläche eukaryotischer Zellen exprimiert werden.

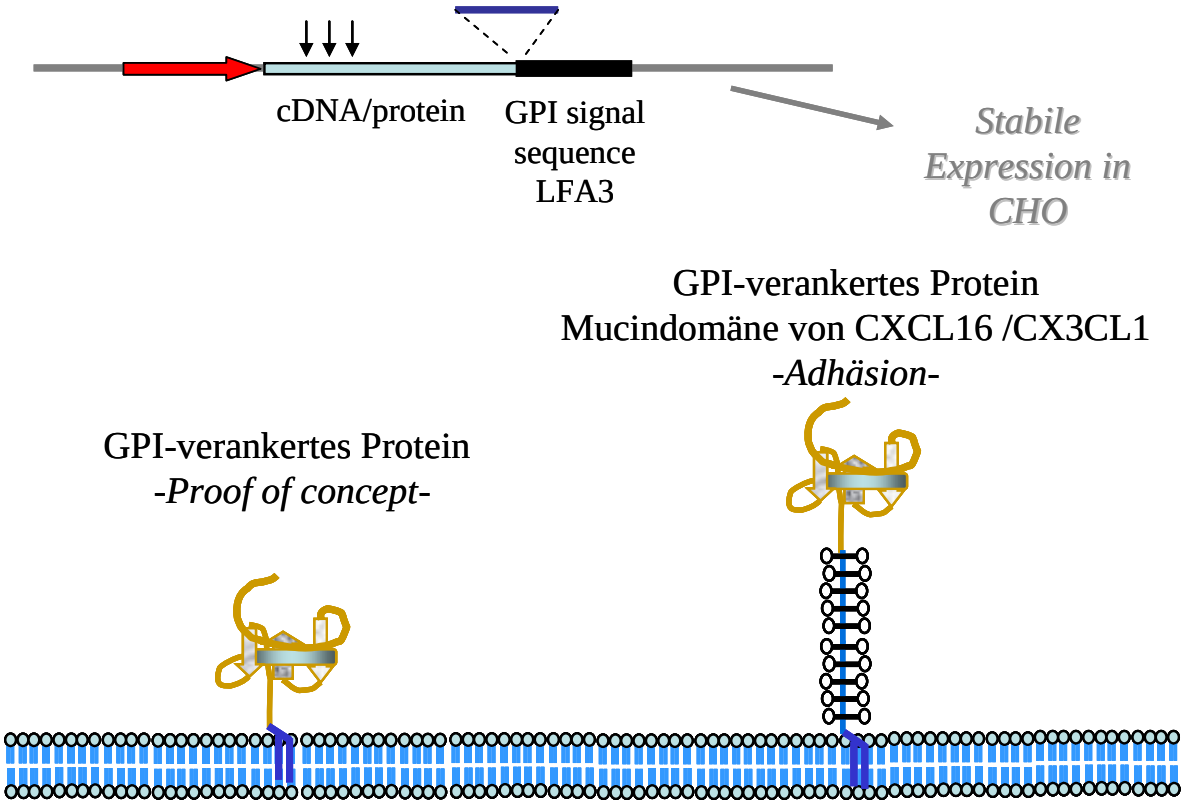


Abb.11: Darstellung des Prinzips der GPI-Verankerung von Proteinen und möglicher zusätzlicher Modifikation Durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines Chemokins und des GPI-Membranankers entfalten sich die Möglichkeiten des sog. „*cell paintings*“. Durch weitere Hinzufügung anderer kodierender DNA-Abschnitte (blau) wie z.B. für die Mucin-artige Domäne des Chemokins CX3CL1 ergeben sich weitere Modifikationen des Prinzips. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Peter J. Nelson.)

Nach Erreichen dieses primären Zieles schloss sich die Isolation der neugebildeten Konstrukte mit möglichst schonender Aufreinigung mittels proteinchemischer Methoden der FPLC (*fast protein liquid chromatography*) an. Um die Funktionalität der gewonnenen Isolate zu überprüfen, wurde zunächst das GPI-Anker-Prinzip durch Reinkorporierungsversuche der Konstrukte in Zellmembranen humaner dermaler Endothelzellen (HDBEC) überprüft.

Um die funktionelle Unversehrtheit der Proteine nachzuweisen wurden Flussadhäsionsversuche durchgeführt, um bei positivem Nachweis eines Effektes der Konstrukte auf die Interaktion zwischen Leukozyt und mit Chemokinkonstrukt transfiziertem Endothel einen Schritt weiterzugehen und die Ergebnisse im *in vivo* Mausversuch zu überprüfen.

III MATERIAL UND METHODEN:

MATERIAL

MEDIEN UND ZUSÄTZE

Medien:

D-MEM Medium	Invitrogen, Carlsbad
Endothelial Cell Growth Medium MV	Promocell, Heidelberg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (I-MDM)	Invitrogen, Carlsbad
MEM Alpha Medium	Invitrogen, Carlsbad
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad

Zusätze:

dialysiertes fetales Kälberserum (dFBS)	Invitrogen, Carlsbad
fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
HT Supplement 50 x	Invitrogen, Carlsbad
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories, Pasching
Supplement Mix for Endothelial Cells MV	Gibco, Carlsbad

Sonstige Reagenzien:

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Mannheim
EDTA	Biochrom AG, Berlin
PBS (1x, 10x)	PAA Laboratories, Pasching
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

MIKROBIOLOGIE

Genotyp des verwendeten Stammes von E. coli DH5α: supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Lysogeny broth (LB)-Medium

1% Bacto-Trypton	BD Biosciences, San Jose
0,5% Hefeextrakt	BD Biosciences, San Jose
85 mM NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
10 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O	Merck, Darmstadt

Super optimal broth with glucose (SOC)-Medium

2% Bacto-Trypton	BD Biosciences, San Jose
0,5% Hefeextrakt	BD Biosciences, San Jose
10 mM NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2,5 mM KCl	Merck, Darmstadt
10 mM $MgCl_2$	Merck, Darmstadt
10 mM $MgSO_4$	Merck, Darmstadt
20 mM Glucose	Merck, Darmstadt

ZELLEN

Zelllinie/Wachstum	Beschreibung	Herkunft	Medium	Zusätze
CHO (transfiziert mit CXCL10-GPI) adhärent	Ovarzellen aus chinesischem Hamster	ATCC, USA Transfektion: Labor P.J. Nelson	MEM Alpha Medium	10% dFBS, 1 % P/S
HDBEC adhärent	Humane dermale Endothelzellline	PromoCell, Heidelberg	Endothelial Cell Growth Medium MV	5% Supplement Mix für MV 1%P/S
HMEC adhärent	Humane mikrovaskuläre Endothelzellline	PromoCell, Heidelberg	D- MEM Medium	10% FBS, 1% P/S

Zelllinie/Wachstum	Beschreibung	Herkunft	Medium	Zusätze
THP-1 (Supensionszellen)	Monozyten-Zelllinie, gewonnen aus einer akuten mono-zytischen Leukämie	ATCC, USA	RPMI 1640	5% FBS, 1% P/S
HUT 78 (Suspensionszellen)	T-Zelllinie, gewonnen aus einem kutanen T-Zell-Lymphom	ATCC, USA	RPMI 1640	10% FBS, 1% P/S
YT- Zellen (Suspensionszellen)	NK- (Natürliche Killerzellen) Zelllinie, gewonnen aus einem NK-Zell-Lymphom	ATCC, USA	IMEM	20% FBS, 1% NaPyruvat

REKOMBINANTE PROTEINE

Protein	Spezies	Verwendung	Firma
rh CXCL10	Human	Alle Versuche	R&D Systems, Minneapolis
rh IL-1ß	Human	Adhäsionsversuch	R&D Systems, Minneapolis

ANTIKÖRPER

Primäre Antikörper					
Epitop	**Wirt**	**Typ**	**Isotyp**	**Hersteller/Ort**	**Konj**
hCXCL10	Kaninchen	polyklonal	IgG	Abcam, Cambridge	
hCXCL10	Ziege	polyklonal	IgG	R&D Systems, Minneapolis	
hCXCR1	Maus	monoklonal	IgG2a	BD Pharmingen, San Diego	
hCXCR2	Maus	monoklonal	IgG1	BD Pharmingen, San Diego	
hCXCR3	Maus	monoklonal	IgG1	BD Pharmingen, San Diego	
hCXCR4	Maus	monoklonal	IgG2a	BD Pharmingen, San Diego	
hCCR1	Maus	monoklonal	IgG2b	R&D Systems, Minneapolis	

Isotyp-Kontrollen				
--	Kaninchen	IgG	Jackson Immunoresearch, Newmarket	
--	Maus	IgG2a	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
--	Maus	IgG1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
--	Maus	IgG2b	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Sekundäre Antikörper				
Maus IgG	Kaninchen	polyklonal	Dako Cytomation, Glostrup	PE
Kaninchen IgG	Schwein	polyklonal	Dako Cytomation, Glostrup	FITC
Ziege IgG	Esel	polyklonal	Acris, Heidelberg	PE

PUFFERLÖSUNGEN

Säulenchromatographie:

Alle bei der Säulenchromatographie verwendeten Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Injektionswasser hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Hypertonischer Lysepuffer:

5 mM Tris/HCl	Invitrogen, Carlsbad
0,1 mM EDTA	Biochrom AG, Berlin
2 mM Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
1 Proteinase-Inhibitor-Tablette/20 ml, pH 7,5	Roche, Basel

Extraktionspuffer:

100 mM Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
1% Triton X-100H	Calbiochem, San Diego
50 mM Tris/HCl	Invitrogen, Carlsbad
5 mM EDTA	Biochrom AG, Berlin
1 Proteinase-Inhibitor-Tablette/20 ml	Roche, Basel

Heparin-Äquilibrierpuffer:

100 mM NaCl	Merck, Darmstadt
20 mM Natriumphosphat	Merck, Darmstadt

0,05% Triton X-100H	Calbiochem, San Diego

Heparin-Elutionspuffer:

1M NaCl	Merck, Darmstadt
20 mM Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
0,05% Triton X-100H	Calbiochem, San Diego

Heparin-Regenerierpuffer:

2 M NaCl	Merck, Darmstadt
20 mM Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
1% Triton X-100	Fluka Biochemika, Buchs

SP- Äquilibrierpuffer:

100 mM NaCl	Merck, Darmstadt
20 mM Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
0,05% Triton X-100H	Calbiochem, San Diego

SP-Elutionspuffer:

750 mM (mucin CXCL10-GPI)	Merck, Darmstadt
bzw. 1M (CXCL10-GPI) NaCl	Merck, Darmstadt
20 mM Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
0,05% TritonX-100H	Calbiochem, San Diego

SP-Regenerierpuffer:

2 M NaCl	Merck, Darmstadt
20 mM Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
1% Triton X-100	Fluka Biochemika, Buchs

TSK-Puffer:

0,025% Triton X-100H	Calbiochem, San Diego
in 1x PBS	PAA Laboratories, Pasching

Puffer für Adhäsionsversuche:

50 mM HEPES 0,5% w/v	AppliChem, Darmstadt
BSA Fraction V	Gibco, Carlsbad
1 mM $CaCl_2$	Merck, Darmstadt
1 mM $MgCl_2$ in	Merck, Darmstadt
Hank´s balanced salt solution (HBSS) ohne Phenolrot pH 7,2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

SDS-PAGE

Anodenpuffer (10x):

1 M Tris/HCl in Wasser, pH 8,3	Invitrogen, Carlsbad

Kathodenpuffer (10x):

1 M Tris/HCl	Invitrogen, Carlsbad
1 M Tricin	Roth, Karlsruhe
1% SDS in Wasser, pH 8,3	Roth, Karlsruhe

SILBERFÄRBUNG

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf 125 ml mit Wasser aufgefüllt.

Fixierbad:

50% Methanol	Merck, Darmstadt
10% Essigsäure	Merck, Darmstadt
40% Wasser	Braun, Melsungen

Inkubationslösung:

12,65 mM Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
0,5 M Natriumacetat	Merck, Darmstadt
0,5 % Glutaraldehyd (20%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
30% Ethanol	Merck, Darmstadt

Silberlösung:

0,5 mM Silbernitrat	Merck, Darmstadt
0,06% Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Entwicklerlösung:	
235,9 mM Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
0,03% Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stopplösung:	
800 mM EDTA	Biochrom AG, Berlin
in Wasser	Braun, Melsungen

SONSTIGE LÖSUNGEN

Auftragspuffer für Agarosegele:	
0,25% Bromphenolblau 0,25%	Merck, Darmstadt
Xylen Cyanol 30%	Merck, Darmstadt
Glycerol in Wasser	Roth, Karlsruhe
Deoxynucleotidtriphosphat (dNTP)-Mix	Amersham Pharmacia, Piscataway
TaqMan® Universal Mastermix	Applied Biosystems, Foster City
First Strained Buffer (5x)	Invitrogen, Carlsbad
Tris-Glycin-SDS-Auftragspuffer	Invitrogen, Carlsbad
NuPAGE®LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad
NuPAGE®Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad

GRÖßENSTANDARD

MagicMark™ Western Standard (Western Blot)	Invitrogen, Carlsbad
SeaBlue (Silberfärbung)	Invitrogen, Carlsbad
1kb- DNA-Ladder (Agarosegele)	Invitrogen, Carlsbad

SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Äkta FPLC-System	GE Healthcare, München
Heparin Hi-Trap, 10 ml	GE Healthcare, München
SP Sepharose Fast Flow, 12 ml	GE Healthcare, München
TSK-Gelsäule, 15 ml	Tosoh Bioscience, Stuttgart

Umsalzung (HiTrap Desalting-Säulen, 2x 5 ml)	GE Healthcare, München

REAGENZIENPAKETE

DuoSet human IP-10 ELISA Development Kit	R&D Systems, Minneapolis
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Luciferase Assay Kit	Promega, Mannheim
Magnetplatte und MATra A Reagenz	Promocell, Heidelberg
QiaPrep Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QiaPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad
Quant-iT dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad
RNase-freies DNase Set (50)	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
Western Breeze® Chemiluminescent Detection Kit	Invitrogen, Carlsbad

ENZYME

Alkalische Phosphatase	Roche, Basel
BsaI Restriktionsenzym	New England Biolabs, Beverly
EcoRI Restriktionsenzym	New England Biolabs, Beverly
NheI Restriktionsenzym	Roche, Basel
Pfx-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Beverly
Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SalI Restriktionsenzym	Roche, Basel
Superscript® Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Beverly
XbaI Restriktionsenzym	New England Biolabs, Beverly

CHEMIKALIEN

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
BD OptEIA Substrate Reagent A	BD Biosciences, San Jose
BD OptEIA Substrate Reagent B	BD Biosciences, San Jose
BioRad-Reagenz	BioRad, Hercules
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase-Inhibitor-Tabletten *Complete*	Roche, Mannheim
TritonX-100	Fluka Biochemika, Buchs
TritonX-100, hydrogenisiert	Calbiochem, San Diego

GERÄTE

Cycler GeneAmp PCR-System 9700	Applied Biosciences, Foster City
Entwickler für Röntgenfilme Curix 60	Agfa, Köln
Elektroporationsgerät E. coli Pulser	BioRad, Hercules
Elektroporationsgerät Gene Pulser	BioRad, Hercules
ELISA-Lesegerät *GENiosPlus*	Tecan, Crailsheim
Flachbodenmikrotiterplatte, 96-Loch	Costar, Corning
Fluorescence Activated Cell Scanner *FACSCalibur*	BD Biosciences, San Jose
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Carlsbad
Schwarz/Weiss-CCD-Camera	Horn Imaging, Aalen
Spritzenpumpe SP210WZ	WPI, Sarasota
TaqMan® 7700	Applied Biosystems, Foster City
Umkehrmikroskop	Leica, Wetzlar
Video-to-FireWire-Converter	Horn Imaging, Aalen
Western Blot Tankblot-Gerät *XCell-II Blot Module*	Novex, San Diego

SOFTWARE

AbiPrism (RT-PCR)	Applied Biosystems, Foster City

CellQuest (FACS-Analyse)	BD Biosciences, Bedford
IC Capture 2.0.0.293 (Videoaufnahme)	The Imaging Source, Bremen
Unicorn 5.11 (FPLC)	Amersham Biosciences, Uppsala
XFluor 4 (ELISA, Migration, Proliferation)	Tecan, Crailsheim

SONSTIGE MATERIALIEN

Elektropotationsküvetten, 4mm Elektrodenabstand	peqlab, Erlangen
FACS-Analysen-Röhrchen 5ml, Rundboden	BD Biosciences, Bedford
µ-slide I ^{0,4} Luer	ibidi, Martinsried
Millex Syringe Driven Filter Unit (0,1µm/ 0,22 µm)	Millipore, Bedford
Rundboden-Mikrotiter-Platte (96-Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sprizenpumpenleitung „Injectomat line“	Fresenius, Bad Homburg

METHODEN

ZELLKULTUR

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und ausschließlich mit sterilen Reagenzien durchgeführt, um Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden. Verwendete Medien und Lösungen wurden vor der Zugabe zu Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert.

Alle adhärenten Zelllinien (mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC sowie HDBEC) und CHO (*Chinese Hamster Ovary*) –Zellen) wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. CHO-Zellen wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet, HMEC sowie HDBEC-Zellen 1:2. Zum Splitten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Inkubation in EDTA-Lösung (1,5 mM EDTA in PBS, 0,1 ml/cm^2) abgelöst, für 3 Minuten bei 220 x g zentrifugiert und in entsprechender Verdünnung neu ausgesät.

Die Suspensionszelllinien wurden im jeweils entsprechenden Medium bis zu einer Dichte von 1-3 x 10^5 Zellen pro ml kultiviert, wobei alle 2-3 Tage nach Abzentrifugation (s.o.) und Resuspension der Zellen das alte durch frisches Medium ersetzt wurde. Bei einer ausreichenden Dichte wurden die Zellen durch Verdünnen der Zellsuspension in frischem Medium 1:10 gesplittet.

Die Zellen wurden in dem für die jeweilige Zelllinie optimalen Medium kultiviert. (siehe Tabelle oben).

Für alle Versuche wurden ausschließlich Lösungen mit pyrogenfreien Materialien hergestellt, um gleiche Bedingungen für *in vitro* und *in vivo* Versuche zu schaffen.

ERNTEN VON ZELLEN

Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die gezüchteten Zellen mit 0,1 ml/cm^2 PBS-EDTA (1,5 mM) von der Flasche gelöst und die Zellen bei 220 x g für vier Minuten zentrifugiert.

Für die Proteinisolierung wurden je 12 x 10^7 mit CXCL10-GPI transfizierte CHO-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und von den 150 cm^2 Kulturflaschen durch Zugabe von 1,5 mM EDTA in PBS für 20 Minuten bei 37°C gelöst. Die Zellsuspensionen wurden in Kulturröhrchen überführt und für vier Minuten bei 220 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml hypertonischem Lysepuffer für 1h bei 4°C rotiert. Anschließend wurden durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 800 x g und 4°C Zellmembranfragmente abgetrennt und der Überstand verworfen. Das im Sediment verbleibende Membranprotein wurde bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Die Zellen wurden im jeweiligen Vollmedium bei einem Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid als Kryoprotektans in einem Isopropanolbehälter für 24 Stunden bei -80°C und anschließend bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -180°C eingefroren.

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in Kulturflaschen mit entsprechendem Vollmedium überführt und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um verbliebene DMSO-Reste zu entfernen.

BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Es wurden nur Trypanblau-negative, d.h. lebendige, Zellen von vier Großquadraten für einen Versuch ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml mittels folgender Formel ermittelt:

$$Zellzahl/ml = \frac{gezählte\ Zellen}{Anzahl\ der\ Großquadrate} \times Verdünnung \times 10^4$$

PROTEINCHEMISCHE METHODEN

AUFREINIGUNG VON (MUCIN) CXCL10-GPI DURCH SÄULENCHROMATOGRAPHIE

ALLGEMEINE THEORIE DER PROTEINAUFREINIGUNG MITTELS SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Die Methode der Chromatographie wird zur möglichst selektiven Isolierung eines Proteins aus einem Gemisch benutzt. Es existieren verschiedene Möglichkeiten der Aufreinigung, die auf den unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen, im zu analysierenden Gemisch enthaltenen, Proteine (z.B. Ladung) beruhen.

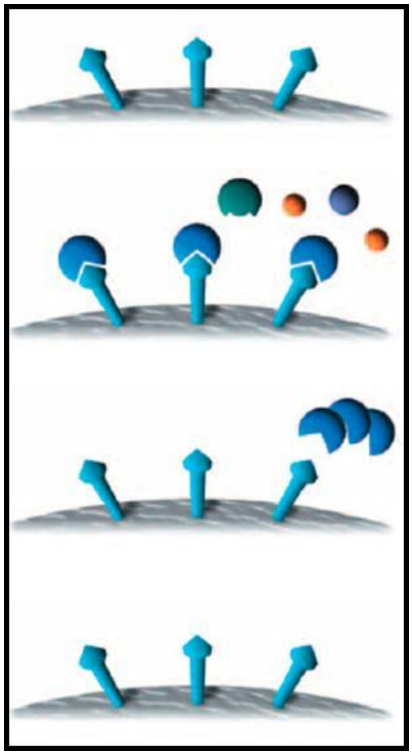
Die Affinitätschromatographie nutzt z.B. einen spezifischen Liganden des gesuchten Proteins und bedient sich dabei der temporären Interaktion zwischen beiden. Einige typische, oft genutzte Möglichkeiten der Interaktion umschließen:

Hormone	Rezeptor
Nukleinsäure	komplementäre Basensequenz
Enzyme	Inhibitor, Cofaktor
Antikörper	Antigen, Virus, Zelle

Um die Bindung wieder aufzuheben, kann man sich spezifischer kompetitiver Liganden bedienen oder die Interaktion mittels Veränderungen des ph-Wertes oder der Ionenstärke beenden.

Neben diesem Prinzip kann auch die Ladung des gesuchten Proteins in einer Ionenaustauschersäule zur Trennung genutzt werden. Die Separation hängt hier von der reversiblen Absorption des geladenen, gelösten Moleküls an die immobilisierte Ionaustauschergruppe der entgegengesetzten Ladung ab. Durch Anwendung eines Elutionspuffers mit anwachsender Ionenstärke werden nach und nach die gebundenen Moleküle ausgewaschen; dabei werden schwach geladene Teilchen aufgrund der Intensität der Bindung zur Säule früher als stark geladene wiedergewonnen.

Als weiteres Prinzip der Aufreinigung wird oft die Auftrennung nach Molekülgröße angewandt: Hierbei durchläuft das verbliebene Substanzgemisch aus kleinen und größeren Molekülen ein Gel aus Dextran oder Polyacrylamid. Die kleinen Moleküle diffundieren dabei in die Hohlräume der Gelpartikel, während die großen sich nur im Lösungsmittel zwischen den Gelpartikeln aufhalten und die Säule deshalb schneller passieren können



1. Äquilibrierung in dem passenden Bindungspuffer

2. Probe wird appliziert. Dabei wird die spezifische, aber prinzipiell reversible Bindung des gesuchten Moleküls begünstigt. Alle anderen Moleküle binden nicht und werden ausgewaschen.

3. Das Zielmolekül wird durch Änderung der Bindungsverhältnisse wiedergewonnen; dies geschieht entweder durch eine Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke oder durch die Applikation eines kompetetiven Liganden. Das Zielmolekül wird gereinigt erhalten.

4. Es erfolgt die Re-Äquilibrierung

Abb.12: Schematische Darstellung der Vorgänge der Affinitätschromatographie. Modifiziert nach Amersham Biosciences, Uppsala

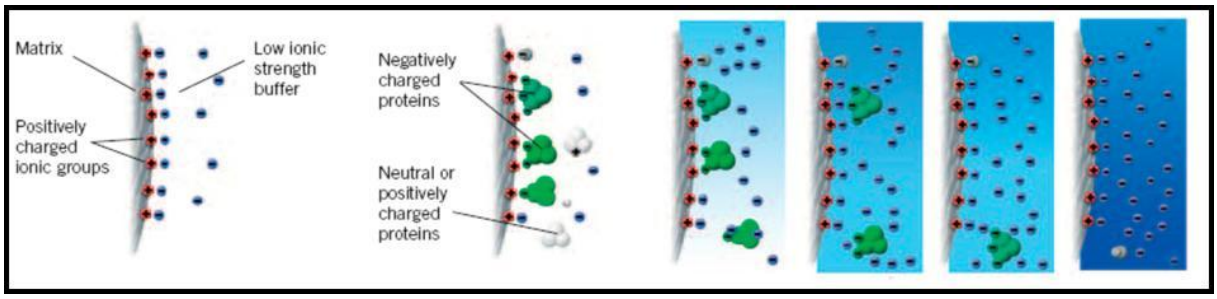


Abb.13: Schematische Darstellung der Vorgänge der Ionenaustauscherchromatographie. Nach Äquilibrierung der Säule in einen Puffer mit nur geringer Ionenstärke erfolgt die Applikation des Proteingemisches. Dabei werden Moleküle, die eine zu der sich auf der Säule befindenden entgegengesetzte Ladung tragen, gebunden und so ankonzentriert. Ungeladene und gleichartig geladene Moleküle hingegen werden ausgewaschen. Durch Anwendung eines Elutionspuffers mit anwachsender Ionenstärke werden nach und nach die gebundenen Moleküle ausgewaschen; dabei werden schwach geladene Teilchen aufgrund der Intensität der Bindung zur Säule früher als stark geladene wiedergewonnen.
Vor der Re-Äquilibrierung erfolgt noch eine Auslösung sämtlich gebundener Strukturen durch die Anwendung eines Puffers mit sehr hoher Ionenstärke. Modifiziert nach Amersham Biosciences. Uppsala

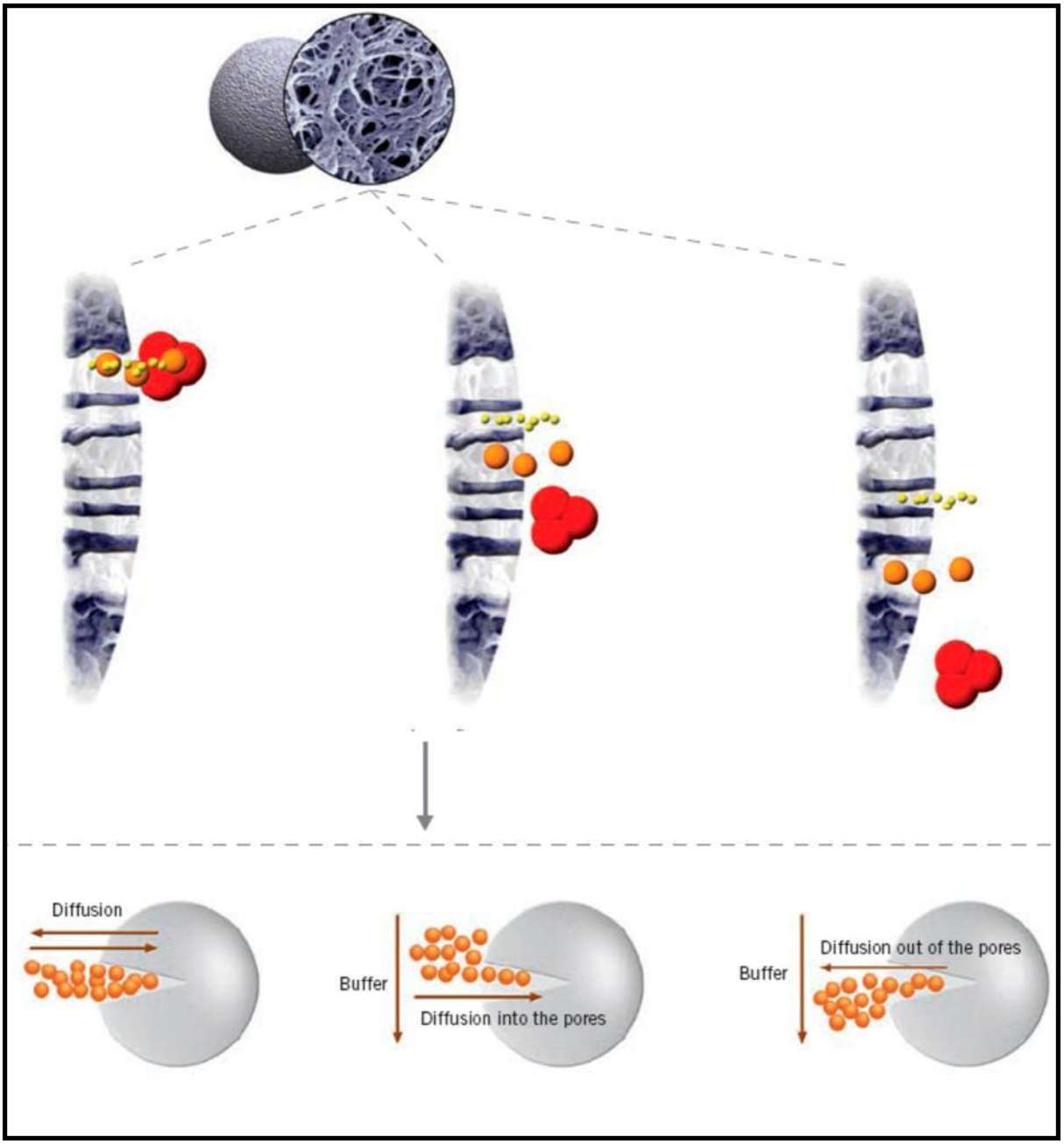


Abb.14: Schematische Darstellung der Vorgänge der Gelfiltrationschromatographie Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der Verwendung eines Gels aus Dextran und Polyacrylamid. Dieses Gel besteht aus kleinen Kugeln, die sowohl zwischen sich Freiräume als auch selbst aufgrund ihrer Porosität Hohlräume für Diffusionsvorgänge lassen. Bei Applikation der Probe diffundieren die Moleküle in diese Poren und wieder heraus und bewegen sich mit dem Puffer (mobile Phase) durch die Säule. Kleine Moleküle diffundieren tiefer in die Poren der Kugeln hinein (Interaktion mit der stationären Phase) und verbleiben so länger in der Säule. Große Moleküle hingegen können nicht in die kleinen Poren hineindiffundieren und werden so eher aus der Säule herausgewaschen; es erfolgt eine Auftrennung nach Molekülgröße. Modifiziert nach Amersham Biosciences, Uppsala

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1,2 x 10^8 stabil mit CXCL10-GPI bzw. mucin CXCL10-GPI transfizierte CHO-Zellen wurden für eine 1 h bei 4°C nach Zugabe von Extraktionspuffer über Kopf rotiert, wobei sich die membrangebundenen Proteine lösen sollten. Nach Zentrifugation für 20 min bei 2750 x g in 4°C wurde der Überstand, in dem sich unter anderem das gesuchte Protein befand, durch einen Filter der Porengröße 0,22 µm von größerem Zellschrott abgetrennt und anschließend auf Eis gelagert oder direkt zur Aufreinigung auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Dazu wurde das Proteingemisch in die Auftragsschleife eines Äkta FPLC-System (GE Healthcare, München) injiziert und dann mit dem jeweiligen Äquilibrierpuffer auf die Säule gespült.

Das FPLC-Gerät war mit einem Computer verbunden, an dem über die Software „*Unicorn 5.11*“ alle Schritte und Parameter wie Flussrate, Puffermischung etc. gesteuert werden konnten. Darüber hinaus konnte am Bildschirm der Verlauf der Chromatographie selbst sowie aller wichtigen Parameter (z.B. elektrische Leitfähigkeit als Maß für die Salzkonzentration, UV-Absorption bei 280 nm als Maß der Proteinkonzentration) verfolgt werden. Die Daten wurden durch die Software aufgezeichnet und zur Auswertung graphisch dargestellt.

Die Sammlung der einzelnen Fraktionen erfolgte ebenfalls computergesteuert über einen angeschlossenen Fraktionensammler, die jeweilige Größe betrug, wenn nicht anders angegeben, 1 ml.

Das Photo auf der folgenden Seite zeigt ein Äkta FPLC-System, wobei sich links im Bild das eigentliche System, in der Mitte die Chromatographiesäule und rechts der Fraktionensammler befinden.

Abb.15: Photographie eines Äkta FPLC-Systems

Bei sämtlichen Arbeitsschritten wurde so pyrogenfrei und steril wie möglich gearbeitet; für alle Puffer wurde z.B. *Aqua ad iniectabilia* bzw. pyrogenfreies PBS als Basis verwandt. Alle möglicherweise unsterilen Puffer wurden vor ihrem Gebrauch ebenso wie die Proteinproben vor Auftrag sterilfiltriert. Alle Säulen lagerten bis zu ihrer Benutzung in 20%igem Ethanol.

HEPARINAFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Hintergrund der Heparin-Affinitätschromatographie ist eine hohe, über die GAG-Bindungsstellen vermittelte Affinität von CXCL10 zu diesem polysulfatiertem, spezifisch Chemokine bindendem Polyanion. Aufgrund der hohen negativen Ladung sind allerdings weitere Effekte des Glykosaminoglykans als Ionenausauscher und der damit verbundene Selektivitätsverlust in Betracht zu ziehen.

Es wurde eine 10 ml Heparin-Sepharose Säule (GE Healthcare, München) verwendet. Nach Äquilibrierung der Säule mit dem zehnfachen Säulenvolumen wurden 7,5 ml des Proteinextrakts aufgetragen. Für beide Konstrukte erfolgte nach zwei Waschschritten (1. Waschschritt: 100 mM NaCl, 20 mM Na_3PO_4 und 0,05% Triton X-100 H; 2. Waschschritt: 400 mM NaCl, sonst idem) die Elution mit 1000 mM NaCl. Die jeweiligen UV-absorbierenden Fraktionen wurden gesammelt und mittels *western blot* und Silberfärbung auf das Vorhandensein von CXCL10-GPI bzw. mucin CXCL10-GPI untersucht.

Die CXCL10-GPI-Protein enthaltenden Fraktionen des Eluats wurden daraufhin vereinigt. Da der Elutionspuffer hyperosmolar war, wurde dieser mit zwei 5 ml Entsalzungssäulen gegen Kationenaustauschäquilibrierungspuffer ausgetauscht. Es wurden zwei 5 ml HiTrap Desalting Säulen (Amersham Biosciences, Uppsala) verwendet.

KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

Rationale der Kationenaustausch-Chromatographie ist die stark positive Ladung von CXCL10. Es wurde eine SP Sepharose Säule (Amersham Biosciences, Uppsala) benutzt. Diese wurde vor dem eigentlichen Chromatographielauf ebenfalls mit 100mM NaCl, 20mM Na_3PO_4 und 0,1% X-100 H (pH 7,4) mit 10 Säulenvolumina äquilibriert.

Nach einem ersten Waschschritt mit 300 mM NaCl, 20 mM Na_3PO_4 und 0,05% Triton X-100 H wurde zur Elution die NaCl-Konzentration für CXCL10-GPI in einer Stufe auf 1 M, für mucin CXCL10-GPI auf 750 mM erhöht. Wiederum wurden sämtliche Fraktionen des Chomatographielaufes gesammelt und mittels *western blot* und Silberfärbung auf das Vorhandensein von CXCL10-GPI bzw. mucin CXCL10-GPI analysiert. Die das jeweilige Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Für mucin CXCL10-GPI wurde nun, um die Konzentration des Detergens Triton X-100 H zu vermindern, der Puffer mittels der Desalting-Säulen gegen 1x PBS ausgetauscht und das isolierte Protein mit einem Filter der Porengröße 0,1 µm sterilfiltriert.

CXCL10-GPI wurde noch einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen.

GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE

Hintergrund der Gelfiltrationschromatographie ist die Auftrennung eines Proteingemisches nach Molekülgröße. Kurz zusammengefasst werden Proteine, die klein genug sind, um in die Poren der Kugeln der stationäre Phase der Säule hineinzudiffundieren, retiniert und verlassen so bei der Elution als letztes die Säule, während große Moleküle, die nicht in die Poren passen, in der mobilen Phase bleiben und so die Säule zuerst verlassen.

Nur im Rahmen der Isolierung von CXCL10-GPI wurde das Eluat durch eine TSK Gelfiltrationssäule (Tosoh, Biosciences, Stuttgart) weiter aufgereinigt. Nach Äquilibrierung mit zwei Säulenvolumina TSK-Puffers wurden pro Chromatographielauf jeweils 700 µl der vereinigten Proteinfraktionen aufgetragen. Zuvor wurden die bislang gesammelten Fraktionen mit einem *Amicon Centricon Concentrator Ultra* mit einer Porengröße von 10.000 MWCO ankonzentriert.

Alle Fraktionen der Läufe wurden gesammelt und mittels *western blot* und Silberfärbung analysiert. Die CXCL10-GPI enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Als letzter Schritt wurde, um die Konzentration des verwendeten Detergenz Triton X-100 H zu reduzieren, ein Pufferwechsel mit Hilfe einer Umsalzungssäule durchgeführt und das Protein in reinem PBS verdünnt. Das Protein wurde mit einem Filter der Porengröße 0,1 µm sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD

Die Bestimmung der Konzentration von (mucin) CXCL10-GPI erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Der Assay beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue G-250* von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung von Proteinen. Die Absorption einer Lösung des Farbstoff-Protein-Komplexes bei 595 nm ist dabei in weiten Bereichen proportional zur Proteinkonzentration. Nach Erstellen einer entsprechenden Kalibrationsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) wurde der Assay nach den Herstellerangaben durchgeführt (Bio-Rad 500-0002).

BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION MITTELS ELISA

Als weitere Bestimmungsmethode der Proteinkonzentration wurde die Methode des ELISA verwendet. ELISA ist die Abkürzung für „***E**nzyme-**l**inked **I**mmuno**s**orband **A**ssay“.

Ein Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen wird auf einem Träger (Cellulose, Polystyrol, usw.) gebunden. Die nicht mit Antikörpern bedeckte Trägeroberfläche wird geblockt, (z.B. mit Rinderserum-Albumin), um eine unspezifische Bindung des Antigens an der Oberfläche zu vermeiden. Dann wird die unbekannte Menge Antigen hinzugegeben und nicht gebundenes Antigen durch Waschen entfernt. In einem zweiten Reaktionsschritt wird nun ein Antikörper gegen das Antigen hinzugegeben, der mit einem Enzym markiert ist.

Dieser markierte Antikörper bindet nun an die Antigene, die bereits von dem an der Festphase absorbierten Antikörper gebunden sind. Durch einen weiteren Waschschritt werden die ungebundenen Antikörper entfernt. Zum Schluss wird das Substrat für das Enzym hinzugesetzt. Durch die von dem Enzym katalysierte Reaktion wird das farblose Substrat in ein gefärbtes Produkt umgewandelt. Um die Enzymreaktion möglichst einfach nachweisen zu können, bevorzugt man Enzyme und Substrate, die bei der Reaktion zu einem Farbumschlag führen und daher photometrisch nachgewiesen werden können. Die am häufigsten benutzten Enzyme sind die Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*) und die Alkalische Phosphatase.

Nach Abstoppen der Reaktion erfolgt die Bestimmung der Konzentration des Produkts in einem speziellen Photometer, wobei die Menge an umgesetztem Substrat proportional zur Menge an gebundenem Erstantikörper ist. Zur Quantifizierung wird ein paralleler Testansatz mit einer bekannten Menge Antigen angesetzt.

Der CXCL10-spezifische ELISA wurde nach dem Protokoll des Herstellers RnD durchgeführt.

SDS - PAGE

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Nach Laemmli (1970) werden Proteine zunächst in einem weitmaschigen Sammelgel aufgrund sich ausbildender Ladungsgradienten zu einer schmalen Bande fokussiert, bevor sie im engmaschigen Trenngel je nach Molekülgröße unterschiedlich retardiert und dadurch voneinander separiert werden. Das anionische Detergens SDS lagert sich durch Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen an Proteine an. Es maskiert die Eigenladung der Proteine und garantiert eine massenproportionale negative Nettoladung. Durch Unterbinden intramolekularer Wechselwirkungen gehen Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins verloren (Denaturierung), so dass die folgende Auftrennung der Proteine nicht mehr nach Form, sondern allein nach ihrer Größe erfolgt. Zum Optimieren der Trennleistung wird zur Separation niedermolekularer Proteingemische ein engmaschiges Trenngel mit hohem Acrylamidanteil ausgewählt und umgekehrt.

Nach Gießen des Trenn- und des Sammelgels und vollständigem Auspolymerisieren in einer Minigel-Apparatur (*Mighty Small*, Hoefer Scientific) wurden 60 µl der Proben mit 2 µl Anti-Proteasen-Gemisch und 20 µl 3fach konzentrierten Auftragspuffer versetzt und für 15 Minuten bei 50°C denaturiert. Diese niedrige Temperatur und längere Erhitzungsdauer wurde zum Schutz des GPI-Ankers gewählt. Des Weiteren sollte einer mit der Denaturierung der Proteine verbundenen Aggregation derselben entgegengewirkt werden, da dies in der Literatur für Membranproteine bei zu starker Erhitzung beschrieben worden ist (Hunte *et al*, 2003). Je

30 µl Probe und 2 µl Größenstandard wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 10 Minuten bei 80 V (Sammelgel) und für 60 Minuten bei 120 V (Trenngel).

ELECTROTRANSFER UND BLOT - ANALYSE

Der *western blot* (Name in Anlehnung an die von Southern entwickelte Methode zum Nachweis von DNA-Fragmenten) ist eine Methode, bei der zuvor elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Trenngel auf einen geeigneten Träger (z.B. Nitrocellulose) überführt werden. Das ursprünglich im Gel vorhandene Trennmuster der Proteine bleibt bei der Erstellung dieser „Kopie“ erhalten und ist somit weiteren analytischen Schritten zugänglich, so dass die Proteine nach dem Transfer einfach identifiziert werden können. Ein spezifischer Antikörper kann nach Bindung an das immobilisierte Protein auf verschiedene Weise nachgewiesen werden. Bei der direkten Nachweismethode werden Antikörper eingesetzt, die mit Enzymen (Peroxidase, Alkalische Phosphatase..) konjugiert, oder in anderer Weise, (z.B. mit Biotin) markiert sind. Beim indirekten Nachweis wird der gebundene primäre Antikörper durch einen seinerseits geeigneten markierten Sekundärantikörper detektiert.

Die mittels Blotting-Technik hergestellten Membranen müssen vor den Nachweismethoden mit Blockierlösungen behandelt werden (z.B. Casein, Ovalbumin, BSA), um alle auf der Membran vorhandenen unbesetzten Bindungsstellen zu maskieren.

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur nach Standardmethoden auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 30 Volt (Towbin, 1979).

Der immunochemische Nachweis von (mucin) CXCL10-GPI auf der PVDF-Membran wurde mit einem Chemilumineszenz-Reagenzienpaket nach dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad) durchgeführt, wobei die Blockierung über Nacht erfolgte. Die bei der Enzym-Substrat-Reaktion entstehende Lichtemission wurde im Dunkelraum auf einem Röntgenfilm dargestellt.

SILBERFÄRBUNG

Eine sensitive Methode, Proteine anzufärben, ist die Silberfärbung. Deren Prinzip ist die Komplexbildung der Ag^{+}-Ionen mit den Asparagin-, Glutamin- und Cysteinresten der Proteine. Die Detektion erfolgt über reduzierende Agenzien, welche die Reduktion der Ag^{+}–Ionen zu metallischen Silber bewirken.

Das Proteingemisch wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, Proteine im Gel für 30 Minuten im Fixierbad fixiert und anschließend über Nacht in der Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser für je zehn Minuten wurde das Gel für 30 Minuten in der Silberlösung inkubiert. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurden die Banden mit der

Entwicklerlösung sichtbar gemacht und bei ausreichendem Färbungsgrad der Vorgang mit EDTA-Stopplösung für mindestens 15 Minuten gestoppt. Anschließend wurde die Stopplösung durch deionisiertes Wasser ersetzt.

IN VITRO VERSUCHE

FACS – ANALYSE

PRINZIP

Die Abkürzung FACS steht für „*Fluorescence Activated Cell Sorting*“ und bezeichnet ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper benutzt werden.

Zur Analyse werden in einer Suspension vorhandene Zellen durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Bei Anregung der Elektronen des Fluorenszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Bruchteil von Sekunden fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Die verwendete Laserwellenlänge von 488nm entspricht der Wellenlänge der geläufigen fluoreszierenden Farbstoffe Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, grün, Emissionswellenlänge von 530 nm) und Phycoerythrin (PE, rot, Emissionswellenlänge von 585 nm). Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Zusätzlich kann man durch die Lichtbeugung und –streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur wie Granularität oder Größe des Zellkerns gewinnen.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Farbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, jedoch über spezifische, unterschiedliche Emissionsspektren verfügen. Dabei wird die Intensität der Fluoreszenz der Probe im Vergleich zu einem unspezifischen Isotyp des entsprechenden Antikörpers gemessen.

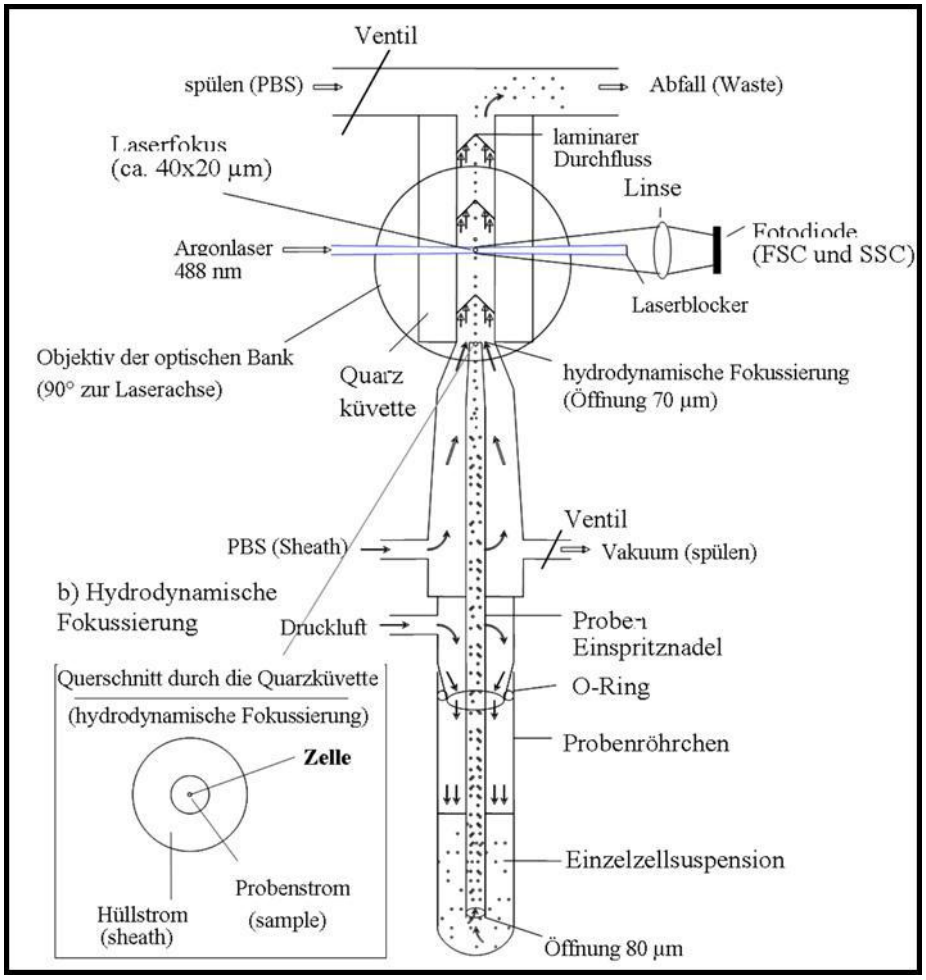


Abb.16: Prinzip des „*Fluorescence Activated Cell Sorting*" (FACS). Zur Analyse werden in einer Suspension vorhandene Zellen durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Bei Anregung der Elektronen des Fluorenszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Bruchteil von Sekunden fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Die verwendete Laserwellenlänge von 488nm entspricht der Wellenlänge der geläufigen fluoreszierenden Farbstoffe Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, grün, Emissionswellenlänge von 530 nm) und Phycoerythrin (PE, rot, Emissionswellenlänge von 585 nm). Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Zusätzlich kann man durch die Lichtbeugung und –streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur wie Granularität oder Größe des Zellkerns gewinnen.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Pro Probe wurden 2 x 10^5 Zellen in 100 µl PBS verwendet und in 96er Rundboden-Mikrotiterplatte pipettiert. Zum Waschen wurden die Proben für jeweils 2 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Puffer ausgetauscht. Die Proben wurden für eine Stunde in 100 µl FBS-freiem Medium mit 10 µg/ml Antikörper gegen das jeweilige Antigen und der jeweils zweite Ansatz in 100 µl FBS-freiem Medium mit 10 µg/ml Isotypkontrolle bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit 100 µl FBS-freiem Medium mit 10 µg/ml vom PE-konjugierten sekundären Antikörper für 40 Minuten bei 4°C inkubiert. Um ein

vorzeitiges Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern, erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper bei Dunkelheit.
Nach Inkubation wurden die Proben erneut zweimal gewaschen und mit 200 µl PBS in FACS-Analysenröhrchen überführt.
Zusätzlich wurde jede Probe mit 1µl Propidiumiodid (PI) angefärbt, um tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, da Propidiumiodid Zellen mit erhaltener Membranintegrität nicht anfärben kann.
Die Auswertung erfolgte mit einem *BD FACS Calibur* Gerät. Pro Ansatz wurden 5 x 10^4 Zellen mit Hilfe der *CellQuest Software* auf einem *Apple I-Mac* untersucht.

NACHWEIS DER INKORPORIERUNG VON CXCL 10 - GPI IN DIE ZELLMEMBRAN

2x 10^6 HBDEC-Zellen wurden mit 1,5 mM EDTA in PBS von der Flasche gelöst, bei 220 x g für vier Minuten zentrifugiert und in 3 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden auf zwölf Löcher einer Rundboden-Mikrotiterplatte verteilt. Je zwei Ansätze wurden mit Medium, (mucin) CXCL10-GPI oder rhIP-10 in einem Gesamtvolumen von 200 µl bei 37°C im Brutschrank für eine Stunde inkubiert.

Anschließend wurde zu je einem der parallelen Ansätze 100 µl PBS zugegeben und bei 220 x g für vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, zu den gewaschenen Zellen wurden 120 ng/ml Phospholipase-C (PLC) gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit 1 ml PBS gewaschen. Dieser Ansatz diente dem Beweis der wirklich über den GPI-Anker stattfindenden Fixierung des Chemokins in der Zellmembran. Hier macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C den Anker zwischen dem Phosphatrest des Inositols und dem Diglyceridrest spalten kann und somit zu einer Loslösung des zuvor gebundenen Proteins führt (Slein und Logan 1985).

Die ohne PLC inkubierten Zellen wurden ebenfalls mit 100 µl PBS gewaschen und bei 220 x g für vier Minuten zentrifugiert. Ab diesem Arbeitsschritt wurde auf Eis gearbeitet. Die Ansätze zur Isotypkontrolle wurden mit 1 µg/µl mIgG1, die Ansätze zur Bestimmung von (mucin) CXCL10-GPI mit 1 µg/µl anti-hCXCL10 für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen je einmal mit 50 µl kaltem Medium und mit 100 µl kaltem PBS gewaschen und für jeweils zwei Minuten bei 440 x g zentrifugiert. 100 µl des Sekundärantikörpers anti-mIgG1-FITC wurden zugegeben und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 440 x g zentrifugiert, einmal mit 100 µl PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Ansätze wurden in 150 µl PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. 3x 10^4 Zellen pro Versuchsansatz wurden am FACS-Gerät ausgewertet.

UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VERSCHIEDENER CHEMOKINREZEPTOREN AUF THP-1-; HUT78- UND YT-ZELLEN

Um die Zelloberfläche der verschiedenen Leukozyten-Zelllinien auf das Vorhandensein verschiedener ausgewählter Chemokinrezeptoren zu untersuchen und somit eine geeignete Linie für die geplanten *in vitro* Adhäsionsversuche auswählen zu können, wurden diese mittels FACS analysiert.

Dafür wurden je 2 x 10^6 Zellen für 3 Minuten bei 220 x g zentrifugiert, im jeweiligen FBS-freiem Medium aufgenommen und auf eine 96-Loch-Platte verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten bei 220 x g und 4°C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und in je 100 µl des jeweiligen FBS-freiem Mediums mit 10 µg/ml Antikörpern gegen CXCR1, -2, -3 oder -4 sowie CCR1 aufgenommen. Die anderen Ansätze wurden in je 100 µl FBS-freiem Medium mit 10 µg/ml der jeweils zugehörigen Isotypkontrolle resuspendiert. Anschließend wurden alle Ansätze für eine Stunde auf Eis inkubiert, sodann wurden die Zellen einmal (wie oben beschrieben) mit kaltem PBS gewaschen. Nun erfolgte die Resuspension in 100 µl FBS-freiem Medium mit 10 µg/ml eines PE-konjugierten Antikörpers gegen Maus-Immunglobuline. Nach einer weiteren 30minütigen Inkubation auf Eis im Dunklen wurden die Zellen noch zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 150 µl kaltem PBS pro Ansatz aufgenommen und am FACS-Gerät analysiert.

NACHWEIS DER CHEMOKIN-KONSTRUKT VERMITTELTEN LYMPHOZYTÄREN ADHÄSION AN ENDOTHELIEN UNTER DURCHFLUSSBEDINGUNGEN (*FLOW ADHESION ASSAY*)

GRUNDGEDANKE DES VERSUCHS UND ALLGEMEINER VERSUCHSAUFBAU

Um den Einfluss des Chemokins auf die Adhäsion sich im Blutfluss befindlicher Lymphozyten zu überprüfen, wurde ein im Wesentlichen auf dem von Hochmuth *et al* 1973 entwickelten System der Durchflusskammer basierender Versuchsaufbau verwendet, bei dem sich in einem erzeugten Fluss befindliche Lymphozyten durch die Zugabe von (mucin) CXCL10-GPI zur festen Adhäsion an immortalisierte Endothelzellen bringen lassen sollten.

Als Ort der Leukozyt-Endothel-Interaktion wurde der kommerziell erhältliche „µ-Slide I ^{0,4} Luer“ der Firma „ibidi“ verwendet, in dem 24h vor dem Versuch die zuvor transfizierten Endothelzellen ausplattiert worden waren. Der *slide* besitzt Luer-Adapter an seinen beiden Enden und kann so problemlos mit anderen Systemen wie Spritzen oder Pumpen verbunden werden. Beim Adhäsionsversuch wurden an diese Perfusorschläuche („*Injectomat line*“, Fresenius) angeschlossen. Der eine Perfusorschlauch wurde mit einer 50 ml Perfusorspritze verbunden, die in einer elektrischen Spritzenpumpe eingespannt den entstehenden Fluss und somit die entsprechenden Scherkräfte regulieren sollte. Der zweite Perfusorschlauch an der anderen Seite des *slides* endete in einer konstant bei 37°C temperierten Zellsuspension, um die Leukozyten anzusaugen.

Durch Variation der Sauggeschwindigkeit der Perfusorpumpe konnten verschiedene Flussgeschwindigkeiten generiert werden. Sämtliche Vorgänge wurden mittels eines Umkehrmikroskops und angeschlossener CCSD-Kamera für spätere Analysen aufgenommen.

Der Versuchsaufbau ist in der folgenden Abbildung skizziert:

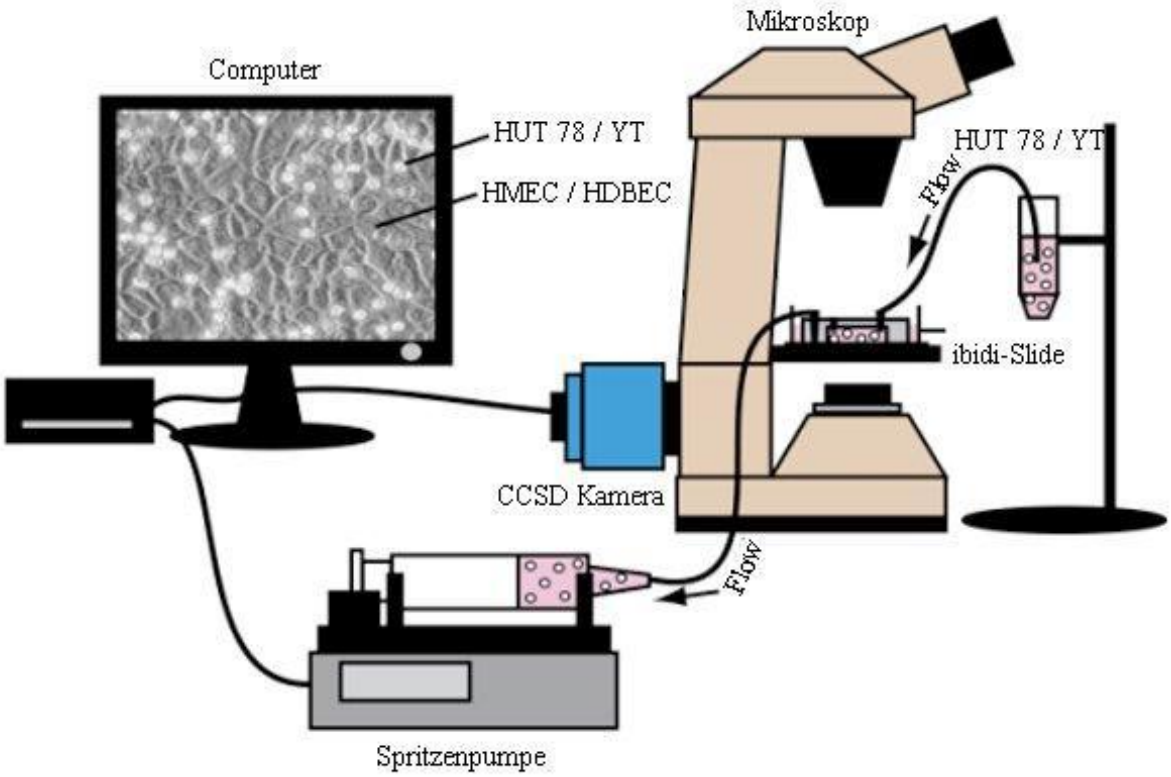


Abb.17: Schematischer Versuchsaufbau des Adhäsionsversuchs. HUT78 bzw. YT-Zellen werden durch den mittels der Spritzenpumpe erzeugten Fluss über einen Endothelrasen mit HMEC bzw. HDBEC-Zellen geleitet (ibidi-*slide*). Die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel können mittels Umkehrmikroskop und angeschlossener CCSD-Kamera am Computerbildschirm in Echtzeit verfolgt und für spätere Analysen aufgezeichnet werden.

Zur Berechnung der im Kanal entstehenden Scherkräfte soll zunächst das den Berechnungen zugrunde liegende Gesetz für laminare Flussverhältnisse vorgestellt werden, um anschließend die einzelnen Größen auf das Experiment bezogen erläutern zu können. Ein laminarer Fluss wird für die mittleren Bereiche des Kanals angenommen, zumal man aufgrund der günstigen Längen-, Breiten- und Tiefenverhältnisse im Kanal von unendlichen, parallelen Platten ausgegangen werden kann. Die wirkenden Scherkräfte berechnen sich in dem Fall nach der Formel

$$\tau = \frac{6\,\eta}{h^2\,b}\,\phi$$

Dabei steht τ für die Scherkraft in [dyn/cm^2], η für die dynamische Viskosität des Versuchspuffers in [(dyn x sec) cm^{-2}] und Φ für die volumetrische Flussrate in [ml/min]. Haut Donahue *et al.*, (2003) bestimmten die exakte Viskosität von *Hank´s balanced salt solution* (HBSS) mit 0,01 (dyn x sec) cm^{-2}.

Mit Hilfe dieser Angabe konnte über die oben genannte Formel für jede beliebige Flussrate die entsprechende, auf die Zellen wirkende Scherkraft berechnet werden.

Die Flussrate wurde auf 0,30 ml/min festgelegt, was bei den benutzten *slides* einer Scherkraft von ca. 0,4 dyn/cm^2 entspricht. Somit befand man sich nicht im Bereich physiologischer Kräfte, die in einer Größenordnung ab 1-2 dyn/cm^2 (Abbassi *et al.*, 1993; House und Lipowsky 1988) beschrieben wurden, konnte jedoch auch empfindlichere Zell-Zell-Interaktionen detektieren.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Etwa 24 h vor den geplanten Versuchen wurden HMEC-Zellen mit dem jeweiligen Chemokin-Konstrukt bzw. der Negativkontolle transfiziert und mit 200 µl Vollmedium in die *slides* ausplattiert. Dabei wurden 5x 10^5 Zellen ausgesät, sodass das Endothel am nächsten Tag zu ca. 95% konfluent war. Nach 12h Inkubation bei 37° C und 5 % CO_2 wurden die *slides* mit PBS gewaschen und das Medium ausgetauscht. Anschließend wurde für weitere 12h inkubiert.

Bei den Versuchsansätzen mit zuvor isoliertem CXCL10 wurden 5x 10^5 mikrovaskuläre dermale Endothelzellen (HDBEC) ausgesät. Sollte der zusätzliche Einfluss einer Endothelstimulation mit IL-1ß untersucht werden, wurde 8 h vor Versuchsbeginn das Medium gegen ein das Cytokin in einer Konzentration von 1 ng/ml enthaltenes ausgetauscht.

1h vor Versuchsbeginn wurde der jeweilige Endothelrasen mit 27 ng/ml CXCL10-GPI bzw. 43 ng/ml mucin CXCL10-GPI (jeweils 15% nach 18facher Ankonzentration) versehen.

Der Versuchspuffer wurde am Versuchstag selbst unmittelbar frisch hergestellt. Anschließend wurden in diesen Puffer HUT78 bzw. YT-Zellen suspendiert, so dass sich eine gewünschte Zellkonzentration in diesem Gemisch von 200 Zellen pro µl einstellte. Es wurde eine der Anzahl der Endothelslides entsprechende Anzahl von Zellsuspensionen mit jeweils 10 ml Volumen hergestellt. Bei konstant gehaltener Temperatur von 37°C wurden die Suspensionen maximal eine Stunde lang zur Verwendung aufbewahrt.

Zur Versuchsdurchführung wurde zunächst die zuvor beschriebene Apparatur aufgebaut. Anschließend wurde der Endothelrasen bei einer Flussrate von 2,0 ml/min mit dem Versuchspuffer gespült.

Nun wurde mit dem Mikroskop ein repräsentativer Abschnitt des Endothels gesucht und scharf eingestellt, um dann mit der HUT78 bzw. YT-Zell-Infusion beginnen zu können. Nach Erreichen stabiler Flussverhältnisse bei einer Geschwindigkeit von 0,3 ml/min konnte mit der Aufnahme bei 175facher Vergrößerung begonnen werden. Es wurde eine Aufzeichnungsdauer von fünf Minuten pro Ansatz festgelegt.

Zur quantitativen Analyse der gewonnen Daten wurde das Blickfeld in acht Quadranten unterteilt und für jeden einzelnen die Zahl der im Laufe des *flow assays* entweder a) fest adhärierenden oder b) zumindest eine rollende Adhäsion eingehenden Leukozyten bestimmt. Zur Definition der festen Adhäsion wurde ein einzuhaltender Mindestzeitraum einer 30 Sekunden andauernden Interaktion zwischen Endothel und Leukozyt festgelegt. Analog dazu war zur Erfüllung des Charakteristikums der rollenden Adhäsion eine signifikante Änderung des zunächst schnellen Flusses der HUT78 bzw. YT-Zellen im Sinne einer Verlangsamung und Abweichung aus dem zentral laminaren Strom in Nähe des Endothels gefordert, ohne dabei jedoch die Kriterien der festen Adhäsion erfüllen zu können. Die Summe der detektierten Ereignisse aller acht Sektoren des Blickfeldes wurde anschließend addiert, wobei ein komplettes Sichtfeld bei der gewählten Vergrößerung einer endothelialen Fläche von 0,625 mm^2 entsprach.

Nach Aufnahme einer Probe wurde ein neuer Endothelslide verwendet. Dazu wurde der wegführende Perfusorschlauch abgeklemmt, dann wurden die Perfusorschläuche vom *slide* getrennt, der *slide* ausgetauscht und ein neuer Perfusorschlauch mit einer neuen, zuvor resuspendierten HUT78 / YT-Zellsuspension verwendet.

FLUORESZENZMIKROSKOPIE

PRINZIP

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass sich im zu untersuchenden Präparat fluoreszierende Stoffe (Fluorochrome) befinden, die mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden. Dabei werden Elektronen durch Photonenabsorption auf ein höheres Energieniveau gehoben (Excitation). Die so angeregten Fluorochrome emittieren bei der Rückkehr auf das ursprüngliche Niveau Licht, welches durch die Stokesverschiebung in der Regel langwelliger als das anregende Licht ist. Anregungs- und Emissionslicht können so im selben Strahlengang optisch getrennt werden. Die Größe der zu untersuchenden Objekte kann aufgrund ihres Eigenleuchtens bei ausreichend hohem Kontrast weit unter der Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskopes liegen.

Der Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops entspricht im Wesentlichen dem eines Auflichtmikroskopes. Das zu beobachtende Objekt wird dabei nicht durchstrahlt, sondern durch das Objektiv beleuchtet. Als Lichtquellen werden in der Regel Quecksilberdampflampen oder Laser eingesetzt. Quecksilberdampflampen emittieren Licht über das gesamte sichtbare Spektrum sowie im ultravioletten Bereich. Die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Wellenlänge wird mit optischen Filtern isoliert und das einfarbige Licht auf das Objekt geleitet, worauf dieses zu fluoreszieren beginnt. Das emittierte, in der Regel längerwellige Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt. Im Strahlengang befindliche Farbteiler trennen anschließend das Fluoreszenzlicht vom anregenden Licht und leiten es in das Okular des Mikroskops, auf eine Fotokamera (analog oder digital) oder auf einen elektronischen Verstärker.

Als gebräuchlichstes Fluochrom wird derzeit das eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) benutzt. Dabei handelt es sich um ein 25-30 kDa großes Polypeptid, das durch blaues Licht einer Wellenlänge von 396 nm und 475 nm anregt werden kann und grünes Licht mit einem Maximum bei der Wellenlänge 508 nm emittiert.. Das eigentliche Chromophor bildet die Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67. Sollen andere, nicht natürlich fluoreszierende Zielstrukturen dargestellt werden, können diese mittels Einsatz Chromophor-konjugierter Antikörper detektiert werden (Immunfluoreszenz). Hier wurde R-phycoerythrin (PE) verwandt. PE wird in der Natur in roten Algen gefunden, es dient physiologischer Weise dort dem Lichtenergietransfer während der Photosynthese. Es ist 240 kDa schwer und besitzt 34 phycoerythrobilin-Fluorochrome pro Molekül; diese hohe Anzahl macht es zu einem idealen Pigment. Das Excitationsmaximum liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 575 nm (rot-orange).

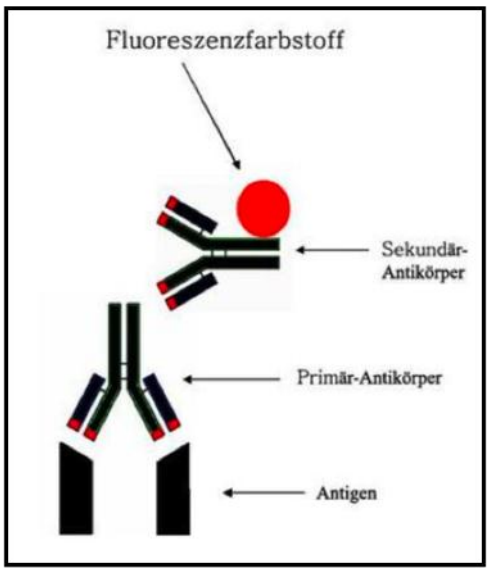


Abb. 18: Prinzip der Immunfluoreszenz. Das Antigen wird mit einem Primär-Antikörper fixiert. Zur Detektion wird ein Chromophor-konjugierter, gegen den Erstantikörper gerichteter Zweiantikörper hinzugegeben, der im Fluoreszenzmikroskop mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt und beobachtet werden kann.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Um sich der Funktionalität der verwandten Antikörper für die Immunfluoreszenz sicher zu sein, wurden in einem Vorversuch zunächst stabil mit mucin CXCL10-GPI transfizierte CHO-Zellen gegen CXCL10 nach unten erläutertem Protokoll gefärbt.

Um einen visuellen Eindruck der Transfektionseffizienz zu erhalten, wurden nach Transfektion von HMEC-Zellen mit CXCL10 sowie GPI-verankertem Ovalbumins (OVA-GPI) als Negativkontrolle 1 x 10^4 Zellen in kleine Schälchen ausplattiert. Zusätzlich wurden nicht transfizierte HMEC-Zellen ausplattiert. Nach 24h wurden die Zellen spezifisch gegen CXCL10 gefärbt und beobachtet. Zunächst wurde dreimal mit PBS gewaschen, dann erfolgte eine 45minütige Inkubation mit spezifisch gegen CXCL10 gerichtetem Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml (in 100 µl FBS-freiem Medium). Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS wurde der PE-konjugierte Detektionsantikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml (in 100 µl FBS-freiem Medium) für 45 Minuten hinzugegeben, nach Ablauf dieser Zeit und einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Mikroskopie unter Verwendung der jeweils geeigneten Filter.

LUCIFERASE-ESSAY

Luciferasen sind Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen reagieren (Oxidation). Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz. Unterschieden werden unter anderem *Firefly*-Luciferasen (aus dem Leuchtkäfer), bei denen Luciferin, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht reagieren und *Renilla*-Luciferasen, die nur Luciferin und Sauerstoff (kein ATP) zur Reaktion benötigen.

<u>*Firefly*-Luciferase katalysierte Reaktion:</u>

Luciferin + ATP → Luciferyladenylat + PPi

Luciferyladenylat + O_2 → Oxyluciferin + AMP + CO_2 + Licht

<u>*Renilla*-Luciferase katalysierte Reaktion:</u>

Luciferin + O_2 → Oxyluciferin + CO_2 + Licht

Die Lichtemission wird dann in einem Luminometer gemessen, wobei die Lichtemission proportional zur Luciferasemenge ist. Somit ist eine relative Beurteilung der Transfektionseffizienz möglich. Im Versuch wurden die transient transfizierten Zellen in eine 6-Loch-Platte überführt. Nach 24h wurde mit PBS gewaschen. Die gesamte

Versuchsdurchführung richtete sich nach dem Protokoll des *Luciferase Reporter Assay System Kits* der Firma Promega (Madison, USA).

Molekularbiologische Methoden

Allgemeine Methoden

Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Für eine analytische oder präparative Auftrennung von DNA–Fragmenten im Agarosegel wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,6 % bis 2 % Agarose verwendet. Alle Gele wurden hierbei mit 0,5fachen TBE-Puffer angesetzt, in der Mikrowelle erhitzt, mit 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gelflüssigkeit versehen und in Gelkammern gegossen. Zum Auftragen wurden die Proben mit 6 x Auftragspuffer (Endkonzentration 1 x) versetzt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE, versetzt mit 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Puffer, verwendet, die Auftrennung erfolgte bei 120 V. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert bzw. die entsprechenden Banden aus den Gelen ausgeschnitten.

Restriktionsverdau von DNA

Für die gezielte Spaltung von DNA-Strängen wurden, je nach zu verdauender DNA-Menge, Ansätze mit einem Gesamtvolumen zwischen 10 und 120 µl verwendet. Dabei wurde pro µg DNA und Stunde Inkubation eine Unit des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Für jeden Verdau wurde der vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlene und mitgelieferte 10 x konzentrierte Puffer verwendet, das bis zum gewünschten Gesamtvolumen fehlende Volumen wurde mit Injektionswasser aufgefüllt. Die Inkubationstemperatur wurde ebenfalls nach den Empfehlungen des Herstellers für das jeweilige Enzym gewählt (bei allen verwendeten Enzymen 37°C). Nach dem Verdau wurden die Proben entweder zunächst bei -20°C zwischengelagert oder direkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde ein kommerziell erhältliches Reagenzienpaket verwendet (*Qiaquick Gel Extraction Kit*). Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers.

Dephosphorylierung der 5`-Enden von DNA-Strängen

Um eine Religation des geöffneten Vektors zu verhindern, wurden die 5`-Enden des Vektors nach der Restriktionsspaltung dephosphoryliert. Dazu wurde nach erfolgtem

Restriktionsverdau eine Einheit („*Unit*“) alkalische Phosphatase pro 50 pmol 5`-Enden zum Restriktionsansatz zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM und eine 10 minütige Erhitzung auf 65°C gestoppt.

LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Für die Ligation wurden Verhältnisse von Vektor- zu Insert-DNA von 1:3 bis 1:10 eingesetzt, immer bezogen auf die Zahl der Basenpaare. Die Reaktionen wurden in der Regel in Ansätzen mit 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt, in denen 1 µl T4-DNA-Ligase (50 Units pro ml) und 2 µl des entsprechenden 10 x Puffers verwendet wurden. Das fehlende Volumen wurde mit Injektionswasser aufgefüllt und die Ansätze anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER E. COLI DH5A-BAKTERIEN

Von einer 50 ml Über-Nacht-Kultur von *E. coli* DH5α in LB-Medium wurde 1 ml abgenommen und damit 1 l LB-Medium beimpft. Bei einer optischen Dichte von 0,7 bei 600 nm wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und für 25 Minuten bei 1300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 1 µl eiskaltem Injektionswasser resuspendiert. Dieser Wasch-Vorgang wurde zweimal wiederholt und das Bakterienpellet anschließend in 50 ml 10% Glycerin aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 Minuten bei 1300 x g und 4°C wurden die pelletierten Bakterienzellen in 4 ml 10% Glycerin aufgenommen, in Aliquots zu je 50 µl auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und in einem Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefroren. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80°C.

TRANSFORMATION VON E. COLI DH5A DURCH ELEKTROPORATION

Für die Transformation von Ligationsansätzen wurden 450-550 ng DNA eingesetzt, für die Transformation von reiner Plasmid-DNA nur 75 ng. Die entsprechende DNA-Menge (in Injektionswasser verdünnt) wurde zu 50 µl kalter Suspension elektrokompetenter *E. coli* DH5α-Bakterien in 10% Glycerin gegeben. Die anschließende Elektroporation erfolgte bei 1,8 V. Sofort danach wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Nach dieser Zeit wurde die gesamte Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die das zur Selektion positiver Klone nötige Antibiotikum (50 µg/ml für Ampicillin, 30 µg/ml für Kanamycin) enthielten und über Nacht bei 37°C inkubiert.

PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS E. COLI DH5A

Die Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* DH5α-Bakterien erfolgte mit kommerziell erhältlichen Reagenzienpaketen und nach den Vorgaben des Herstellers. Für präparative Ansätze wurden das *QiaPrep Plasmid Mini* bzw. *Midi Kit* und für die Gewinnung von Plasmiden für die Transfektion eukaryontischer Zellen das *Endofree Plasmid Maxi Kit* verwendet.

POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Um spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion nach Maniatis et al. (1982) angewendet.

Im Rahmen der PCR-Programme wurde die Anlagerungstemperatur für die Primer immer 4 bis 5°C unter deren Schmelztemperatur (T_m) gewählt. Die Konzentrationen der Primer sowie der Deoxynukleotidtriphosphate (dNTP) richteten sich nach den Empfehlungen der Hersteller der verwendeten Polymerasen. Die folgende Tabelle soll die verwendeten Ansätze darstellen, anschließend folgt eine tabellarische Übersicht des benutzten Programms:

	Mucin-Domäne	**CXCL10**
cDNA	300 ng	600 ng
Puffer (10x)	10% Pfx-Puffer	10% Taq-Puffer
dNTPs	0,4 mM	0,2 mM
Vorwärtsprimer	0,4 µM	0,4 µM
Rückwärtsprimer	0,4 µM	0,4 µM
$MgSO_4$	2 mM	-
Polymerase	1 µl Pfx	0,2 µl Taq
H_2O ad injec.	ad 25 µl	ad 25 µl

Programm	
Mucin-Domäne	**CXCL10**
5 min. 94° C	5 min. 94° C
30 sec 94° C 1 min 60° C	30 sec 94° C 1 min 64° C

2,5 min 68° C 40 Zyklen	2,5 min 72° C 30 Zyklen
7 min. 72° C	7 min. 72° C

RNA-ISOLATION AUS CHO-DHFR$^{(-/-)}$-ZELLEN UND REVERSE TRANSKRIPTION

Zur Kontrolle der Transfektion wurde das Gen mittels RNA-Isolation und reverser Transkription wieder aus den Zellen isoliert und die DNA sequenziert. Dadurch wurde gewährleistet, dass die kodierende Sequenz vollständig erhalten blieb.

Zur Isolation der RNA wurden nach Transfektion und Selektion die CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen mit EDTA-Lösung (1,5 mM EDTA in PBS, 0,1 ml/cm^2) inkubiert und anschließend 3 Minuten lang bei 220 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder sofort weiter bearbeitet oder bis zur RNA-Isolation bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels des kommerziell erhältlichen Reagenzienpakets *RNeasy Mini* Kit (Qiagen) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Dabei wurde zusätzlich die eventuell noch vorhandene DNA mittels DNase abgebaut. Am Ende der Prozedur wurde die RNA in 33 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Für die reverse Transkription wurden zunächst von den 33 µl des Säulen-Eluats 3 µl für eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase (RT^{-minus}-Ansätze) abgenommen. Anschließend wurde folgende Gebrauchslösung, die für sämtliche Ansätze verwendet werden konnte, hergestellt:

Substanz/Lösung	Konzentration
First Strand Buffer (5x)	60,4 %
DTT	13,4 mM
dNTP	1,5 mM
RNasin	2,5 U/µl
Acrylamid	0,7 µM
Hexamernukleotide (10x)	3,4 %

Die RT^{-minus}-Ansätze der Negativkontrolle wurden mit RNase-freiem Wasser auf 30 µl aufgefüllt (entspricht einer RNA-Verdünnung von 1:10). Anschließend wurde zu jedem Versuchsansatz 13,9 µl Gebrauchslösung zugegeben. Zu allen anderen Proben (RT^{+}-Ansätze) wurde zusätzlich noch je 1 µl Superscript™ Reverse Transkriptase pipettiert. Alle Ansätze inkubierten für eine Stunde bei 42°C unter leichtem Rütteln in einem schüttelfähigen Heizblock. Danach erfolgte die Lagerung bei -20°C.

KLONIERUNG VON CXCL10–GPI UND MUCIN CXCL10-GPI

Bei der Generierung der CXCL10-GPI-Konstrukte standen für die Amplifikation der kodierenden Sequenz des Chemokins das „(p)human IP10“-Plasmid [Luckow], sowie für die Amplifikation der für die Mucin-Domäne des CX3CL1-Moleküls kodierenden Sequenz eine cDNA Probe aus einer Biopsie einer entzündeten humanen Niere zur Verfügung:

Kodierende Sequenz von CXCL10:

```
    ccagtctcagcaccatgaatcaaactgcgattctgatttgctgccttatctttctgactc
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
    ggtcagagtcgtggtacttagtttgacgctaagactaaacgacggaatagaaagactgag

      S   L   S   T   M   N   Q   T   A   I   L   I   C   C   L   I   F   L   T   L


                              XbaI
                               |
    taagtggcattcaaggagtacctctctctagaaccgtacgctgtacctgcatcagcatta
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    attcaccgtaagttcctcatggagagagatcttggcatgcgacatggacgtagtcgtaat

      S   G   I   Q   G   V   P   L   S   R   T   V   R   C   T   C   I   S   I   S

    gtaatcaacctgttaatccaaggtctttagaaaaacttgaaattattcctgcaagccaat
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
    cattagttggacaattaggttccagaaatctttttgaactttaataaggacgttcggtta

      N   Q   P   V   N   P   R   S   L   E   K   L   E   I   I   P   A   S   Q   F

    tttgtccacgtgttgagatcattgctacaatgaaaaagaagggtgagaagagatgtctga
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240
    aaacaggtgcacaactctagtaacgatgttacttttttcttcccactcttctctacagact

      C   P   R   V   E   I   I   A   T   M   K   K   K   G   E   K   R   C   L   N

    atccagaatcgaaggccatcaagaatttactgaaagcagttagcaaggaaatgtctaaaa
241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
    taggtcttagcttccggtagttcttaaatgactttcgtcaatcgttcctttacagatttt

      P   E   S   K   A   I   K   N   L   L   K   A   V   S   K   E   M   S   K   R

    gatctcct
301 -------- 308
    ctagagga

      S   P
```

Kodierende Sequenz der Mucindomäne von CX3CL1:

```
    GGCGGCACCTTCGAGAAGCAGATCGGCGAGGTGAAGCCCAGGACCACCCCTGCCGCCGGG
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
    CCGCCGTGGAAGCTCTTCGTCTAGCCGCTCCACTTCGGGTCCTGGTGGGGACGGCGGCCC

    G  G  T  F  E  K  Q  I  G  E  V  K  P  R  T  T  P  A  A  G

    GGAATGGACGAGTCTGTGGTCCTGGAGCCCGAAGCCACAGGCGAAAGCAGTAGCCTGGAG
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    CCTTACCTGCTCAGACACCAGGACCTCGGGCTTCGGTGTCCGCTTTCGTCATCGGACCTC

    G  M  D  E  S  V  V  L  E  P  E  A  T  G  E  S  S  S  L  E

    CCGACTCCTTCTTCCCAGGAAGCACAGAGGGCCCTGGGGACCTCCCCAGAGCTGCCGACG
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
    GGCTGAGGAAGAAGGGTCCTTCGTGTCTCCCGGGACCCCTGGAGGGGTCTCGACGGCTGC

    P  T  P  S  S  Q  E  A  Q  R  A  L  G  T  S  P  E  L  P  T

    GGCGTGACTGGTTCCTCAGGGACCAGGCTCCCCCCGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAGGG
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240
    CCGCACTGACCAAGGAGTCCCTGGTCCGAGGGGGGCTGCGGTTTCCGAGTCCTACCTCCC

    G  V  T  G  S  S  G  T  R  L  P  P  T  P  K  A  Q  D  G  G


    CCTGTGGGCACGGAGCTTTTCCGAGTGCCTCCCGTCTCCACTGCCGCCACGTGGCAGAGT
241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
    GGACACCCGTGCCTCGAAAAGGCTCACGGAGGGCAGAGGTGACGGCGGTGCACCGTCTCA

    P  V  G  T  E  L  F  R  V  P  P  V  S  T  A  A  T  W  Q  S

    TCTGCTCCCCACCAACCTGGGCCCAGCCTCTGGGCTGAGGCAAAGACCTCTGAGGCCCCG
301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 360
    AGACGAGGGGTGGTTGGACCCGGGTCGGAGACCCGACTCCGTTTCTGGAGACTCCGGGGC

    S  A  P  H  Q  P  G  P  S  L  W  A  E  A  K  T  S  E  A  P

    TCCACCCAGGACCCCTCCACCCAGGCCTCCACTGCGTCCTCCCCAGCCCCAGAGGAGAAT
361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 420
    AGGTGGGTCCTGGGGAGGTGGGTCCGGAGGTGACGCAGGAGGGGTCGGGGTCTCCTCTTA

    S  T  Q  D  P  S  T  Q  A  S  T  A  S  S  P  A  P  E  E  N

    GCTCCGTCTGAAGGCCAGCGTGTGTGGGGTCAGGGACAGAGCCCCAGGCCAGAGAACTCT
421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 480
    CGAGGCAGACTTCCGGTCGCACACACCCCAGTCCCTGTCTCGGGGTCCGGTCTCTTGAGA

    A  P  S  E  G  Q  R  V  W  G  Q  G  Q  S  P  R  P  E  N  S

    CTGGAGCGGGAGGAGATGGGTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCTTCCAGGACTGGGGG
481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 540
    GACCTCGCCCTCCTCTACCCAGGGCACGGTCGCGTGTGCCTACGGAAGGTCCTGACCCCC

    L  E  R  E  E  M  G  P  V  P  A  H  T  D  A  F  Q  D  W  G

    CCTGGCAGCATGGCCCACGTCTCTGTGGTCCCTGTCTCCTCAGAAGGGACCCCCAGCAGG
541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 600
    GGACCGTCGTACCGGGTGCAGAGACACCAGGGACAGAGGAGTCTTCCCTGGGGGTCGTCC
```

```
    P  G  S  M  A  H  V  S  V  V  P  V  S  S  E  G  T  P  S  R

    GAGCCAGTGGCTTCAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATG
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 660
    CTCGGTCACCGAAGTCCGTCGACCTGGGGATTCCGACTCCTTGGGTAGGTACGGTGGTAC

    E  P  V  A  S  G  S  W  T  P  K  A  E  E  P  I  H  A  T  M

    GACCCCCAGAGGCTGGGCGTCCTTATCACTCCTGTCCCTGACGCCCAGGCTGCCACCCGG
661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 720
    CTGGGGGTCTCCGACCCGCAGGAATAGTGAGGACAGGGACTGCGGGTCCGACGGTGGGCC

    D  P  Q  R  L  G  V  L  I  T  P  V  P  D  A  Q  A  A  T  R

    AGGCAG
721 ------ 726
    TCCGTC
```

Beide Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert, wozu die folgenden Oligonukleotide als Primer benutzt wurden.

I.) CXCL10 :

Vorwärtsprimer IP10 FW long:

5’- GAG GAA CCT **GAA TTC** CCA GTC TCA GCA CC -3’

Rückwärtsprimer IP10 RV long:

5’- CCC CTC TGG T**GC TAG C**AG AGA TCT TTT AG -3’

Als Schmelztemperatur ergab sich für beide Primer eine Temperatur von 69,5° C, so dass in der PCR eine Temperatur von 64° C gewählt wurde.

Über die Primer am 5`-Ende wurden unmittelbar an die kodierende Sequenz angrenzend eine *Eco*RI-Schnittstelle und am 3`-Ende eine *NheI*-Schnittstelle angefügt. Aufgrund einer in der kodierenden Sequenz von CXCL10 enthaltenen Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xba*I wurde hier auf die Verwendung von NheI zurückgegriffen, was einen sicheren Verdau und anschließend auch eine Ligation gewährleistete, da *Xba*I und *Nhe*I kompatible Enzyme sind, d.h. man kann mit *Xba*I und *Nhe*I geschnittene DNA wieder ligieren, wobei die Schnittstelle dabei allerdings verloren geht. Es entstand ein 320 bp großes Fragment.

II.) Mucin-ähnliche Domäne von CX3CL1 (Fractalkine):

Vorwärtsprimer Fractalkine fw:

5’- CGG CGG GCG **TCT AGA** GGC GGC ACC TTC G -3’

Rückwärtsprimer Fractalkine rv:

5’- CGT GTC GGC **GCT AGC** CTG CCT CCG GG -3’

Als Schmelztemperatur ergab sich hier für beide Primer eine Temperatur von ca. 64° C, so dass in der PCR eine Temperatur von 60° C gewählt wurde.

Bei der Amplifikation des DNA-Fragments wurde über die Primer (analog zu CXCL10) unmittelbar an die kodierende Sequenz angrenzend am 5`-Ende eine *Xba*I- und am 3`-Ende eine *Nhe*I-Schnittstelle angefügt. Das so entstandene Fragment war 766 bp lang.

Nach der Amplifikation wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA aus den Gelstücken extrahiert. Anschließend wurde mittels DNA-Sequenzierung auf Richtigkeit bzw. eventuelle Mutationen überprüft. Als Referenzen dienten hierbei die GenBank-Einträge NM_001565.1 für CXCL10 bzw. NM_002996 (bp 365-1092) für die mucin-ähnliche Domäne. Für die zunächst anschließende Klonierung von CXCL10-GPI stand ein pEF-dhfr-Vektor zur Verfügung, in den vorher bereits der für die GPI-Signalsequenz kodierende Bereich der mRNA des GPI-verankerten Zelladhäsionsmoleküls LFA-3 sowie das Chemokin RANTES (für andere Experimente) kloniert worden waren.

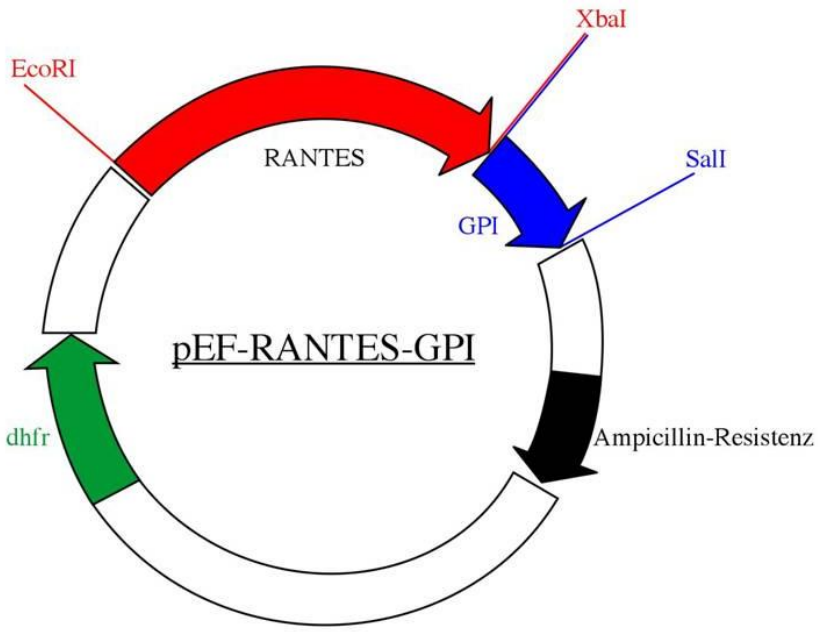


Abb. 19: Vereinfachte schematische Darstellung des pEF-RANTES-GPI-Vektors. Dargestellt sind die für die Klonierung von (mucin) CXCL10-GPI wichtigen Schnittstellen der Restriktionsenzyme, die sich im Vektor befindenden klonierenden Sequenzen für das Chemokin RANTES sowie den Membrananker GPI sowie die für die Selektion transfizierter Bakterien bedeutender Ampicillinresistenz sowie das Gen für die Dihydrofolatreduktase (dhfr), was bei der Selektion transfizierter CHO-Zellen zur Selektion diente.

Vollständigkeitshalber zusätzlich die kodierende Sequenz von GPI:

```
   XbaI
   |
   tctagaacaacctgtatcccaagcagcggtcattcaagacacagatatgcacttataccc
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
   agatcttgttggacatagggttcgtcgccagtaagttctgtgtctatacgtgaatatggg

   S  R  T  T  C  I  P  S  S  G  H  S  R  H  R  Y  A  L  I  P

                                                    SalI
                                                      |
   ataccattagcagtaattacaacatgtattgtgctgtatatgaatgtattatagtcgac
61 ---------+---------+---------+---------+---------+--------- 119
   tatggtaatcgtcattaatgttgtacataacacgacatatacttacataatatcagctg

   I  P  L  A  V  I  T  T  C  I  V  L  Y  M  N  V  L  *  S
```

Dieser Vektor wurde mit *Eco*RI und *Xba*I verdaut, durch eine Agarosegelelektrophorese von dem vorher einklonierten Gen für das Chemokin RANTES getrennt und zunächst das ebenfalls mit *Eco*RI und mit *Nhe*I geschnittene und im Agarosegel gereinigte CXCL10-Amplikon ligiert. Aufgrund der in der kodierenden Sequenz von CXCL10 enthaltenen Schnittstelle für das ansonst benutzte Restriktionsenzym *Xba*I wurde hier auf das komplementäre Enzym *Nhe*I zurückgegriffen. Für den Prozess der Ligation wurde der beschriebene Ansatz mit der T4-Ligase verwendet.

Um eine ausreichende Menge des Plasmids für die anstehenden Versuche zur Verfügung zu haben, wurde es mittels Elektroporation zunächst in *E. coli* DH5α transformiert. Über eine im Vektor enthaltene Ampicillin-Resistenz wurden verschiedene Klone selektiert und vermehrt und daraus wiederum Plasmid-DNA isoliert. Durch einen analytischen Restriktionsverdau mit *Eco*RI, *Nhe*I und/oder *Sal*I wurden die gewünschten, d.h. die das entsprechende Restriktionsmuster exprimierenden Klone identifiziert.

Einer der so selektionierten positiven Klone wurde nun vermehrt, die Plasmid-DNA isoliert und nach einer erneuten Sequenzierung mittels eines Verdaus mit *Nde*I linearisiert und in CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen transfiziert. „dhfr“ steht hierbei für „Dihydrofolatreduktase“. Die Zellen sind für dieses Enzym defizient, d.h. sie können das Schlüsselenzym des Thymin-Biosynthese-Weges nicht exprimieren und sind daher für ihr Wachstum und Überleben auf ein Medium angewiesen, dem Nukleotide zugesetzt wurden (in Form von HT-supplement, einer Mischung aus Hypoxanthin und Thymidin). Dieses macht man sich insofern zu Nutze, dass der pEF-dhfr-Vektor das Gen für die Dihydrofolatreduktase trägt und somit elegant zur Selektion von erfolgreich transfizierten und nicht-transfizierten Zellen beiträgt. Indem die transfizierten Zellen für 24-36 Stunden im Vollmedium, danach aber in einem Medium ohne Nukleotide inkubiert wurden, konnten nur solche Zellen überleben, die das Plasmid

aufgenommen hatten und aufgrund der darauf befindlichen Gene in der Lage waren, die Dihydroflatdehydrogenase zu exprimieren.

Zur Klonierung des mucin CXCL10-GPI-Konstrukts wurde zunächst der pEF-dhfr-Vektor mit dem RANTES-GPI-Konstrukt durch einen Restriktionsverdau mit *Xba*I zwischen der Chemokin-Sequenz und dem für die GPI-Signalsequenz kodierenden Bereich geöffnet. Anschließend wurde das mit *Xba*I und *Nhe*I geschnittene Amplikon der CX3CL1-cDNA hineinligiert. Aufgrund der verwandten Restriktionsenzyme ergibt sich bei der Ligation der mucin-ähnlichen Domäne Fractalkines mit dem das Chemokin und den Membrananker enthaltenden Vektor sowohl die Möglichkeit der 5' - 3', als auch der 3' – 5' Insertion. Um diejenigen Vektoren mit der gewünschten 5' – 3' Insertion ausfindig zu machen, wurde zur Kontrolle ein analytischer Verdau mit *Xba*I und *Sal*I durchgeführt und die entstehenden Fragmente ihrer Größe nach untersucht. Die Methode bedient sich des Umstandes, dass von *Nhe*I und *Xba*I geschnittene DNA zwar wieder ligiert werden kann, die Enzymschnittstelle nach erfolgter Ligation jedoch verloren ist. Folglich entstehen je nach unterschiedlicher Insertion der Fractalkine-Sequenz Fragmente verschiedener Länge. Bei der inkorrekten Insertion sollte nur eine dem GPI-Anker entsprechende Bande von 120 bp nachgewiesen werden, in anderen Fall entstünde eine 842 bp große, dem Mucindomäne-GPI-Komplex entsprechende Bande. Anschließend wurde wie bei der oben beschriebenen Klonierung RANTES gegen CXCL10 ersetzt.

Das pEF-dhfr-mucin CXCL10-GPI-Plasmid wurde in CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen transfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde wiederum mittels mRNA-Isolierung, reverser Transkription und anschließender Sequenzierung überprüft.

SUBKLONIERUNG VON (MUCIN) CXCL10-GPI

Um die Richtigkeit des Prinzips der CXCL10-GPI bzw. mucin CXCL10-GPI vermittelten Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beweisen zu können, sollten mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) transient transfiziert werden, um dann im Adhäsionsversuch getestet zu werden. Als Plasmid wurde hierbei pIRES2-eGFP verwendet. Der Expressionsvektor pIRES2-eGFP enthält in unmittelbarer Nachbarschaft zur „*multiple cloning site*" (MCS), in die das jeweilig interessierende Gen hineinkloniert werden kann, eine interne Ribosomenbindestelle (IRES, *internal ribosome binding site*) des *Encephalomyocarditis virus* (EMCV), gefolgt vom Gen für das verbesserte grün fluoreszierende Protein (eGFP, *enhanced green fluorescent protein*). Aufgrund dieser internen Ribosombindungsstelle können sowohl das eingefügte Gen als auch eGFP als Kontrolle separat von einer mRNA translatiert werden. Durch die Translation von eGFP kann die Transfektionseffizienz überprüft und ggf. einfach eine Unterscheidung der transfizierten von nicht-transfizierten Zellen erfolgen (z.B. mittels FACS). Zur Subklonierung der CXCL10-Konstrukte wurden diese mittels eines Restriktionsverdaus mit *Eco*RI und *Sal*I aus dem jeweiligen pEF-dhfr-Vektor ausgeschnitten.

Nachdem die entsprechenden DNA-Fragmente durch Auftrennung im Agarosegel und anschließende Aufreinigung der jeweiligen Banden isoliert worden waren, wurden diese in den ebenfalls mit *Eco*RI und *Sal*I geschnittenen pIRES2-EGFP-Vektor ligiert. Anschließend wurden mit dem Plasmid *E. coli* DH5α-Zellen transformiert und auf Kanamycin-haltigen Platten ausplattiert. Dies diente der Selektion transformierter und nicht-transformierter Bakterien, da der Vektor eine Kanamycin-Resistenz beinhaltet. Verschiedene Klone wurden vermehrt, die Plasmid-DNA isoliert und durch einen analytischen Restriktionsverdau untersucht. Ein Plasmid, welches das zu erwartende Bandenmuster zeigte, wurde ausgewählt und die DNA-Sequenz des einklonierten Gens bestimmt.

STABILE TRANSFEKTION VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN

Um in eukaryontischen Zellen ein gewünschtes Gen exprimieren zu können, muss es gelingen, die entsprechende Sequenz stabil in die chromosomale DNA der Zielzellen zu integrieren. Dazu wird linearisierte DNA in die Zielzellen eingebracht (Transfektion). Danach erfolgt mittels geeigneter Methoden eine Selektion derjenigen Zellen, welche das gewünschte Gen exprimieren.

Um die CXCL10-Konstrukte stabil in CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen zu exprimieren, wurden die Plasmide zunächst durch einen Restriktionsverdau mit NdeI (für pEF-dhfr) linearisiert, da lineare DNA leichter über Rekombination in chromosomale DNA integriert werden kann als zirkuläre.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag 1:2 gesplittet, sodass am Tag der eigentlichen Transfektion ein zu etwa 80% konfluenter Zellrasen verwendet werden konnte. Die Zellen wurden dann mit 1,5 mM EDTA in PBS (0,1 ml/cm^2) abgelöst, für 3 Minuten bei 220 x g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. 1 x 10^7 Zellen pro Transfektionsansatz wurden in 400 µl PBS aufgenommen und 30 µg der linearisierten DNA in 90 µl PBS zugegeben. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in der Suspension bei 960 µF und 260 V elektroporiert und danach erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen mit entsprechendem Kulturmedium in eine Zellkulturflasche gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium gegen ein entsprechendes Selektionsmedium ausgetauscht.

TRANSIENTE TRANSFEKTION VON MIKROVASKULÄREN ENDOTHELZELLEN

MAGNETOFECTION

Die Magnetofection ist eine einfache und hoch effiziente Transfektionsmethode, die Magnetfelder benutzt, um Partikel, die Nukleinsäuren enthalten, in Zellen einzuschleusen.

Dabei wird DNA mit kationischen Nanopartikeln assoziiert und über das Anlegen eines geeigneten Magnetfeldes in die Zelle eingebracht.

Die Nanopartikel bestehen aus Eisenoxid, die mit einem kationischen Überzug versehen sind, ihre Assoziation mit den Vektoren verläuft über elektrostatische Wechselwirkungen. Durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes erfolgt die Einschleusung in die Zielzellen, die Aufnahme geschieht hierbei über den Prozess der Endo- bzw. Pinocytose, wodurch die Zellmembran unversehrt bleibt. Die Ausschleusung aus dem Endosom geschieht im Anschluss über osmotische Schwellung aufgrund der eingebrachten Kationen.

Folgende Abbildung stellt das Konzept der Magnetofection noch einmal vereinfacht dar:

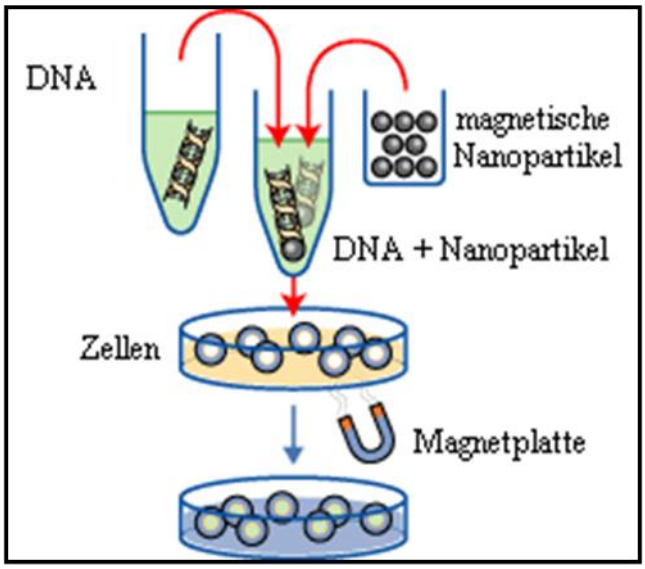


Abb.20: Prinzip der Magnetofection. DNA wird mit magnetischen Nanopartikeln assoziiert und über das Anlegen eines äußeren Magnetfeldes in die Zellen eingebracht.

Es wurde das kommerziell erwerbliche *Kit* der Firma Promocell verwendet, die Versuchsdurchführung richtete sich nach dem mitgelieferten Protokoll. 30-60% konfluente mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) wurden verwendet.

Um die optimalen Transfektionsbedingungen zu ermitteln, wurden in mehreren Vorversuchsreihen unterschiedliche DNA-Mengen eines *renilla*-Luciferase-Plasmids eingesetzt, wobei die eingesetzte Menge der Nanopartikel der DNA-Menge angepasst wurde (1 µl „MATra-A“ Reagenz zu 1 µg DNA). In den Hauptversuchen wurden die subklonierten pIRES-eGFP-(mucin) CXCL10-GPI-Plasmide verwendet.

Die Transfektionseffizienz wurde für die Vorversuche anhand der Luciferaseaktivität, für die Chemokinkonstrukte anhand der GFP-Expression und mittels FACS-Analyse untersucht, dafür wurden die Zellen entweder in eine 6-Loch-Platte (Luciferase), eine kleine

Zellkulturschale (Fluoreszenzmikroskopie) oder in eine Zellkulturflasche (FACS-Analyse) ausplattiert.

ELEKTROPORATION

Die Elektroporation ist eine Transfektionsmethode, die sich der Elektrizität bedient, Zellmembranen permeabel zu machen, um so DNA in Zellen einzuschleusen. Durch ein elektrisches Feld, das in der Regel durch einen schnell entladenden Kondensator innerhalb eines Elektroporators erzeugt wird, werden in der Zellmembran mikroskopisch kleine Löcher erzeugt, die sich innerhalb von Millisekunden wieder schließen. Die Poreninduktion bedingt einen Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran und die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile. Fügt man dem Umgebungsmedium vorher aber freie DNA hinzu, kann diese von den Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert werden. Der Versuchsansatz richtete sich nach der von Hernandez *et al*. (2004) beschriebenen Methode:

Für die transiente Transfektion von immortalisierten mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) wurde für den anschließenden Versuch RPMI 1640–Medium mit einem Serumanteil von 30% versehen. In dieses wurden jeweils pro Ansatz 2 x 10^6 Endothelzellen gegeben. Dann wurden unterschiedliche DNA-Mengen von 30 bis 70 µg DNA zugegeben, so dass sich pro Transfektionsküvette ein Gesamtvolumen von 400 µl ergab. Der gesamte Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor der eigentliche Transfektionsschritt mittels Elektroporation erfolgte. Vorversuche zeigten optimale Ergebnisse bei einer Spannung von 200V und einer Kapazität von 960 µF. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die nun transfizierten Endothelzellen in Kulturflaschen und zu einem geringeren Anteil in die später bei den Zelladhäsionsversuchen verwandten *slides* sowie kleine Kulturschälchen für die Immunfluoreszenz ausplattiert.

Die Analyse der Transfektionseffizienz erfolgte nach 24h mittels FACS-Analyse.

PROLIFERATIONSVERSUCH

CXCL10 hat zusätzlich zur Leukozyten rekrutierenden eine proliferationshemmende Wirkung, so dass diese Eigenschaft in der anti-tumoralen Therapie ausgenutzt werden könnte. Tumorzellen könnten so an der Ausbildung neuer Blutgefäße gehindert werden.

Für die quantitative Bestimmung zellulärer Proliferation bzw. Aktivierung kann 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) genutzt werden. Der Nachweis basiert darauf, dass das gelbe Tetrazoliumsalz MTT in metabolisch aktiven Zellen in purpurfarbenes Formazan umgewandelt wird. Dieser Vorgang wird durch Succinat-Dehydrogenasen, die Teil der Atmungskette in aktiven Mitochondrien sind, bewerkstelligt. In wässriger Umgebung sind die Formazankristalle nicht löslich und fallen aus, können jedoch

mit Isopropanol gelöst und am ELISA-Lesegerät bei 550 nm photometrisch quantifiziert werden. Eine Zu- oder Abnahme proliferierender Zellen resultiert in einer Zu- oder Abnahme der metabolischen Aktivität, was sich auf die Farbbildung durch die entstandenen Formazankristalle auswirkt.

Am Vortag des Versuches wurden $5x10^4$ HDBEC-Zellen in 100 µl Medium in Flachbodenplatten ausgesät. Nach 12h wurden die Zellen in zusatzfreiem Medium kultiviert. Nach weiteren 12h wurde das jeweilige Proliferationsmedium (1% Supplement MV) hergestellt und mit den jeweiligen Zusätzen auf jeweils 200 µl angesetzt:

1. reines Proliferationsmedium
2. Medium mit TSK-Säulenpuffer
3. Medium mit P/S
4. Medium mit 30% denaturiertem CXCL10-GPI bzw. mucin CXCL10-GPI
5. Medium mit rh CXCL10
6. Medium mit (mucin) CXCL10-GPI

Es erfolgte ein Mediumwechsel gegen das den jeweiligen Zusatz enthaltendes Proliferationsmedium. Nach einer Inkubationszeit von 24h, 48h bzw. 72h wurden je 50 µl einer 1 mg/ml MTT-Lösung hinzugegeben. Es wurde 3 h bei 37 °C inkubiert, daran anschließend erfolgte für 5 min eine Zentrifugation bei 2000g. Nun wurde der Überstand verworfen, die entstandenen Formazankristalle mit je 100 µl Isopropanol und 0,4 N HCL gelöst und die Lichtabsorption bei 550 nm am ELISA-Lesegerät gemessen.

IV ERGEBNISSE

KLONIERUNG UND EXPRESSION VON CXCL10 – GPI UND MUCIN CXCL10 – GPI IN CHO-ZELLEN

Durch die beschriebene Klonierung wurde ein Konstrukt generiert, welches für CXCL10 kodiert und am 3`-Ende, d.h. am C-Terminus des Proteins, eine Signalsequenz zur GPI-Verankerung enthält, was alle Möglichkeiten des sogenannten „*cell surface engineering*“ oder „*cell paintings*“ eröffnet.

Folgende Abbildung stellt den Klonierungsgang noch einmal dar:

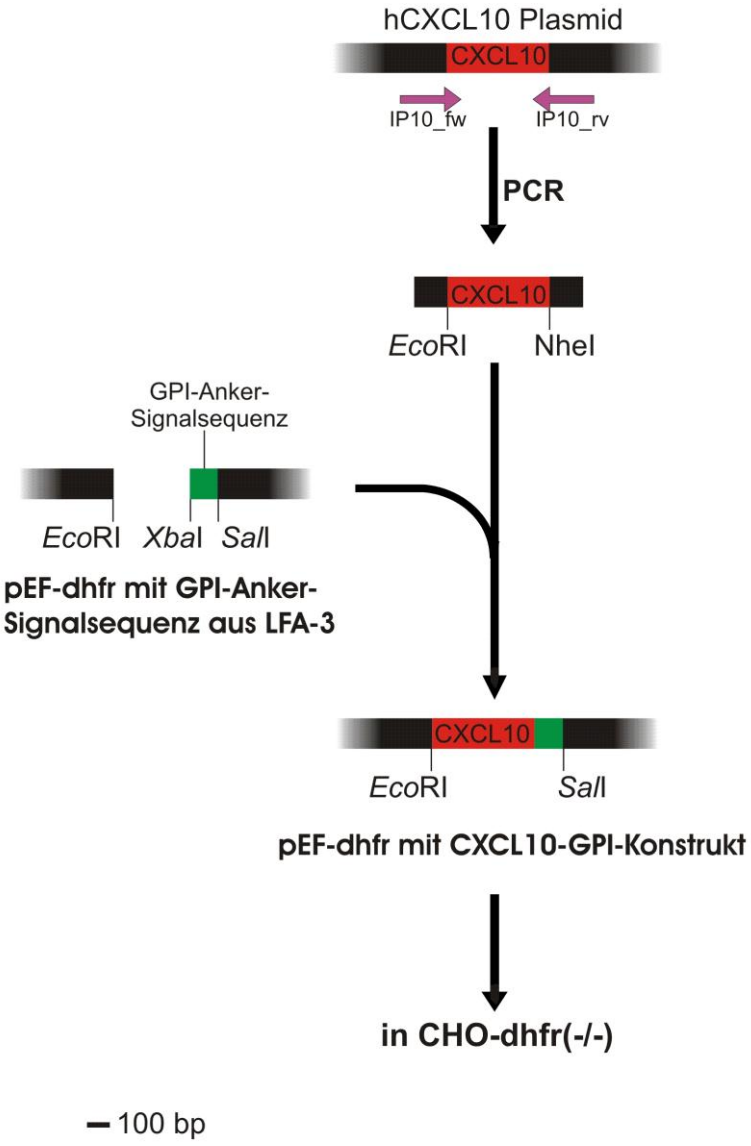


Abb.21a): Schematische Darstellung der Klonierung von CXCL10-GPI.

Das Plasmid wurde in *E.coli* DH5α-Zellen vermehrt. Daraus wiederum konnte die Plasmid-DNA isoliert werden. Zur Überprüfung der Klonierungsergebnisse wurde ein analytischer DNA–Verdau mit den Restriktionsenzymen *Eco*I und *Sal*I durchgeführt.

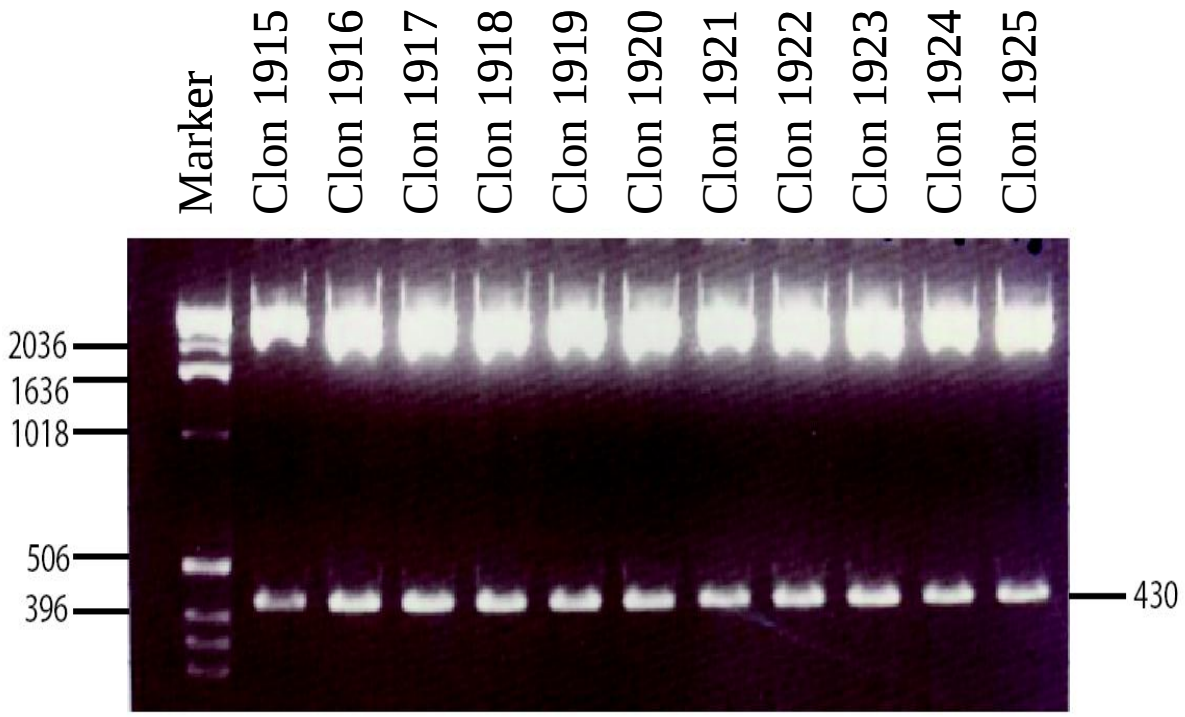
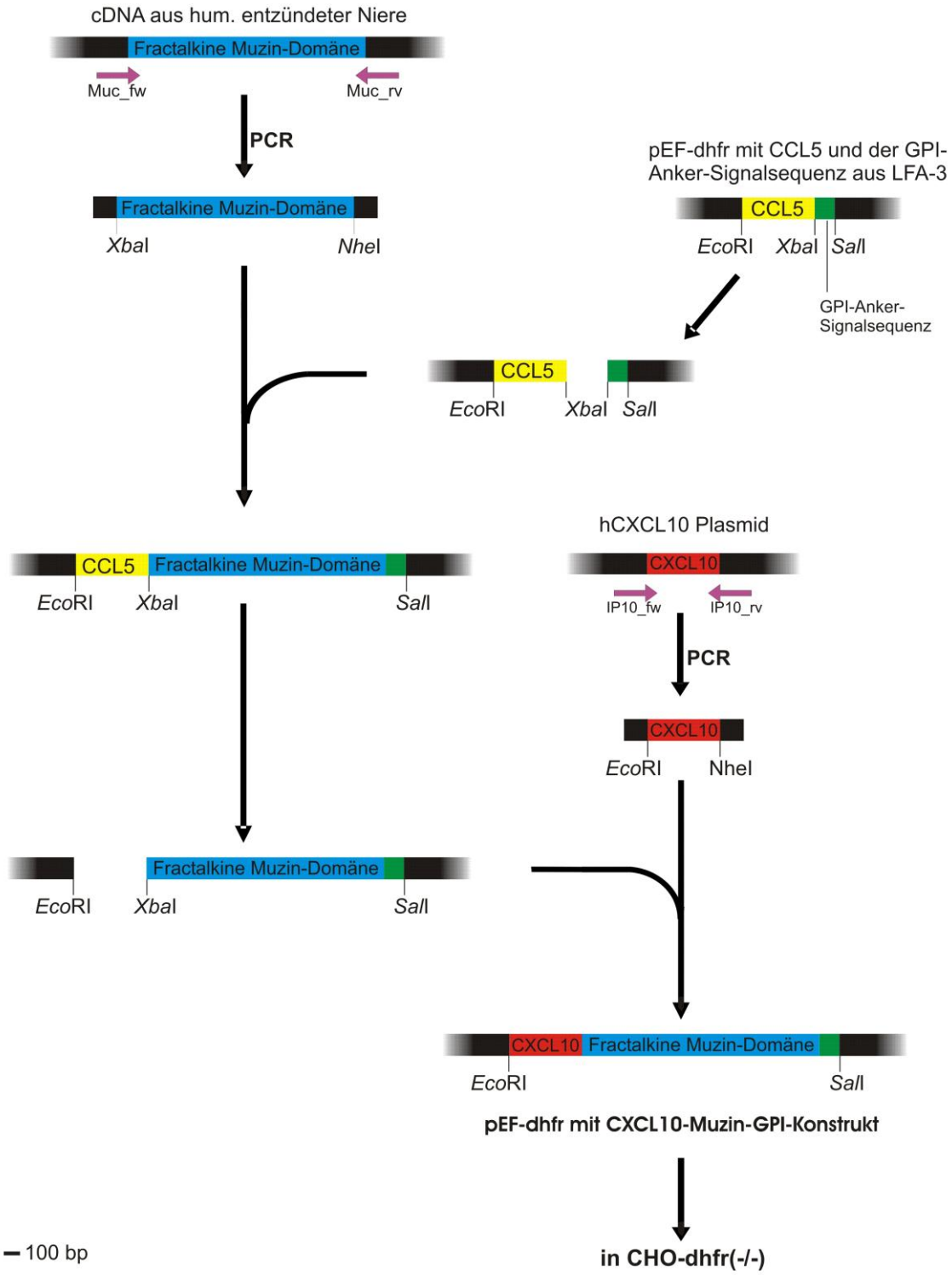


Abb. 21b): Analytischer DNA-Verdau von CXCL10–GPI mit den Restriktionsenzymen EcoI und SalI
Dargestellt ist auf der ganz linken Spur der Größenstandard, auf allen weiteren Spuren DNA –Proben der transfizierten *E.coli* DH5a-Zellklonlinien (1915-1925). Die Analyse erfolgte auf einem 2% Agarose-Gel.
Die in allen Bahnen erkennbare Bande entspricht CXCL10 – GPI in einer Größe von ca. 430 Basenpaaren (bp).

Alle ausgewählten Klone zeigten die für CXCL10-GPI erwartete Bande in einer Größe von 430 bp, so dass anschließend die DNA isoliert und durch Elektroporation in Dihydrofolatreduktase-negative Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen) transfiziert werden konnte.

Es ergab sich ein analoges Vorgehen für mucin CXCL10-GPI: Der pEF-dhfr-Vektor enthielt am Ende ein Konstrukt, das in direkter Folge für CXCL10, die Mucin-artige Domäne von CX3CL1 und die GPI-Anker-Signalsequenz kodierte. Auch hier zunächst die Klonierung noch einmal übersichtlich dargestellt:



Nach Vermehrung der Plasmid-DNA in *E. coli* DH5α, analytischem Verdau mit *Eco*I und *Sal*I, der die erwartete Bande für mucin CXCL10-GPI in einer Größe von ca. 1150 bp bei allen ausgewählten Klonen nachwies (siehe Abbildung 22) und folgender Aufreinigung der DNA erfolgte die Transfektion in CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen. Vorher wurde die korrekte Sequenz der Chemokinkonstrukte mittels DNA-Sequenzierung kontrolliert.

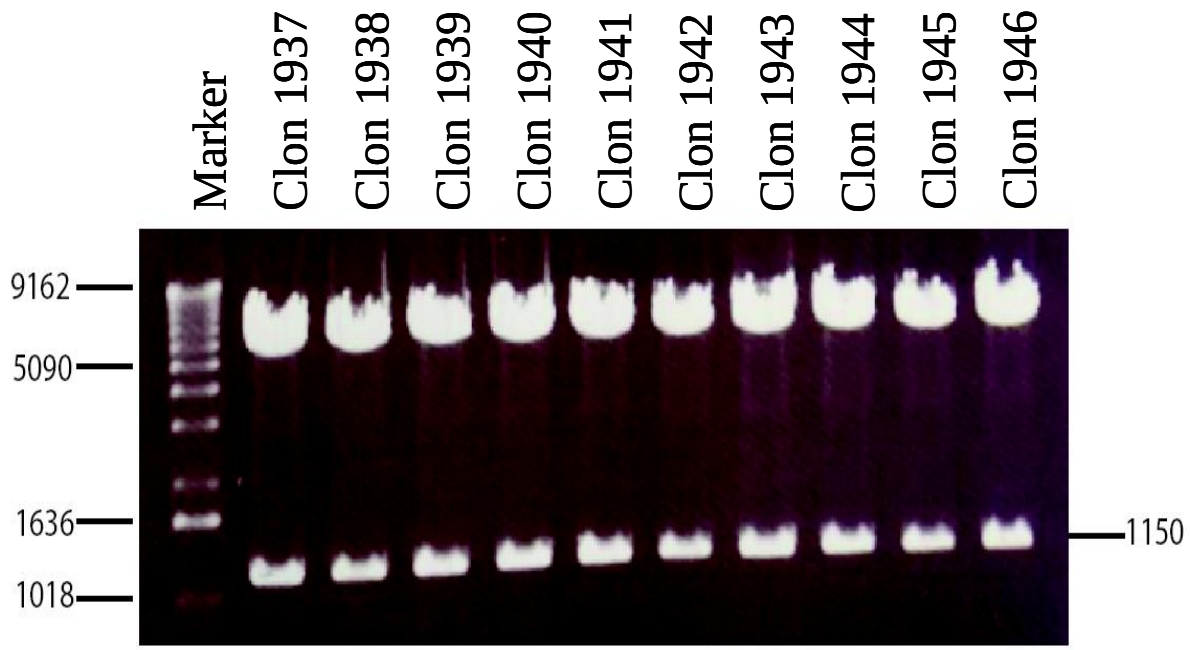


Abb. 22: Analytischer DNA-Verdau von mucin CXCL10 – GPI mit den Restriktionsenzymen EcoI und SalI. Dargestellt ist auf der ganz linken Spur der Größenstandard, auf allen weiteren Spuren DNA –Proben der transfizierten *E.coli* DH5a-Zellklonlinien (1937-1946). Die Analyse erfolgte auf einem 0,6 % Agarose-Gel. Die in allen Bahnen erkennbare Bande entspricht mucin CXCL10–GPI in einer Größe von ca. 1150 Basenpaaren (bp).

NACHWEIS DER EXPRESSION DER CXCL10-KONSTRUKTE AUF DER OBERFLÄCHE DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN

Um die Expression der generierten Konstrukte an der Zelloberfläche nachweisen zu können, wurden jeweils 5 x 10^4 der zuvor stabil transfizierten CHO-Zellen gegen hCXCL10 gefärbt und mithilfe der FACS-Technik analysiert. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte CHO-Zellen. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

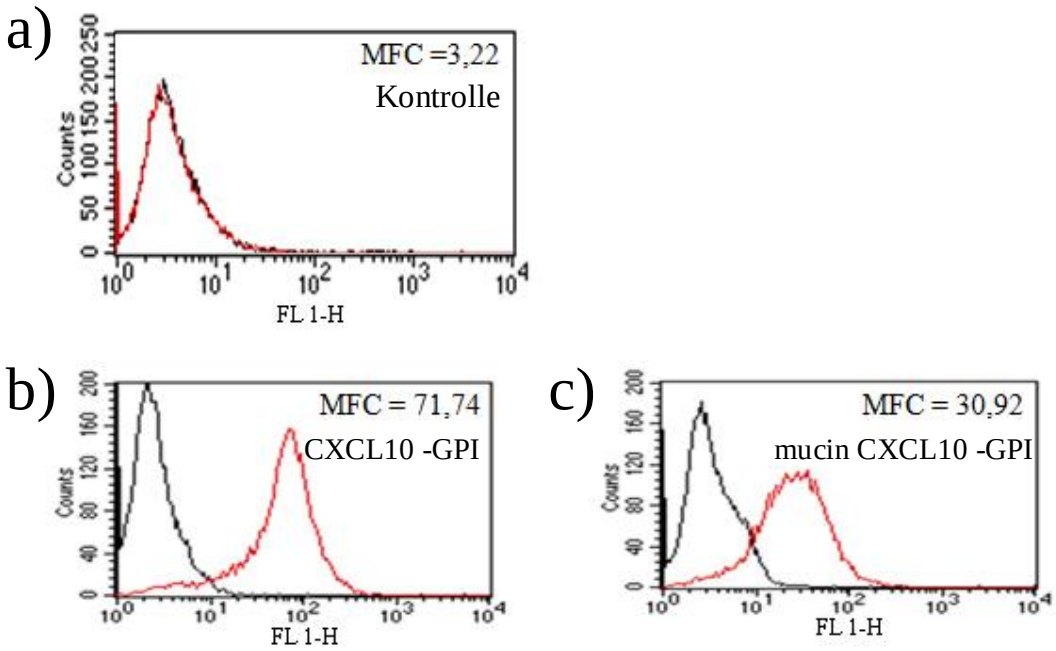


Abb.23: FACS-Analyse der Expression von CXCL10 – GPI und mucin CXCL10 - GPI auf der Zellmembran von CHO-Zellen. Extrazelluläre Färbung von jeweils 5 x 10^4 Zellen mit einem gegen CXCL10 gerichteten Antikörper bzw. dem entsprechenden Isotypen sowie einem sekundären, FITC-konjugierten *anti-rabbit IgG* Antikörper. Dargestellt ist jeweils auf der Abszisse die detektierbare Fluoreszenz, die proportional zur Menge des an die jeweilige Zielstruktur gebundenen Antikörpers ist. Die Ordinate zeigt die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Die rote Kurve beschreibt die Bindung des Antikörpers an die Zellmembran, die schwarze die des Isotypen**.**
a) Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte CHO-Zellen untersucht (oben), hier ist keine spezifische Bindung des Antikörpers zu beobachten.
b) CXCL10–GPI zeigt eine deutliche Oberflächenexpression.
c) Auch mucin CXCL10-GPI wird in ausreichender Anzahl auf der Oberfläche von CHO-Zellen exprimiert.

Die Histogramme zeigen für beide Konstrukte eine deutliche Verschiebung des Maximums der Antikörperkurve zu Werten höherer Fluoreszenzintensität hin. Da sich diese direkt proportional zur gebundenen Menge Antikörper am Zielantigen CXCL10 verhält, beweist das Versuchsergebnis die Expression des gesuchten Proteins auf der Zellmembran. In der Negativkontrolle findet man hingegen keinen Unterschied im Bindungsverhalten von Antikörper und Isotyp, so dass die Spezifität des Experiments nachgewiesen werden kann.

Weiterhin kann man aufgrund des eingipfeligen Kurvenverlaufs auf die Existenz einer homogenen Zellpopulation schließen, die in ihrer Gesamtheit das identische Konstrukt exprimiert.

AUFREINIGUNG VON CXCL10-GPI MITTELS FPLC

Zur Aufreinigung der beiden Proteinkonstrukte wurde die Methode der Chromatographie benutzt. Aufgrund der durch Einfügung der Mucin-Domäne veränderten Eigenschaften von mucin CXCL10-GPI wurde zur Isolierung dieses Proteins ein gesondertes Reinigungsprotokoll entwickelt und benutzt.

Zunächst sollen die Ergebnisse des für die Gewinnung von CXCL10-GPI verwandten Reinigungsregimes vorgestellt werden:

AUFREINIGUNG VON CXCL10 - GPI DURCH HEPARIN -AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Als erster Reinigungs- und Ankonzentrierungsschritt wurde die Affinität des basischen Proteins zu dem Polykation Heparin ausgenutzt.

Nach Inkubation in einem hypertonischen Puffer wurden 12 x 10^7 mit CXCL10-GPI transfizierte Zellen (CHO-CXCL10-GPI) mit 10 ml Extraktionspuffer (s.o.) lysiert. Großer Zelldetritus wurde mittels Zentrifugation sedimentiert; der das Proteinkonstrukt enthaltene Überstand auf eine zuvor äquilibrierte Heparin *HiTrap*–Säule aufgetragen.

Aufgrund der hohen Affinität und der daraus resultierenden starken Bindung des Chemokins an die stationäre Phase der Säule wurde eine Elution von CXCL10-GPI bei relativ hoher Salzkonzentration erwartet. Für eine möglichst scharfe und verlustfreie Trennung des gewünschten Moleküls von restlichen Proteinen wurde über den Schritt eines linearen Konzentrationsgradienten ein Schema mit zwei Konzentrationsstufen entwickelt: Bis zu einer Salzkonzentration von 400 mM NaCl zeigte sich eine stabile Bindung von CXCL10-GPI an Heparin, so dass sich an den initialen Waschvorgang ein erster Auftrennungsschritt mit einer Salzkonzentration von 400 mM NaCl und der abschließende Elutionsschritt mit 1 M NaCl anschlossen.

Die Abbildungen 24, 25 und 26 zeigen zur Illustration das von der Software Unicorn aus den gemessenen UV-Absorptionen (Einheit: *milli absorbtion units*, mAU) der gesammelten Fraktionen erstellte Chromatogramm eines repräsentativen Laufes mit den verschiedenen Elutionspeaks sowie die analytische Auswertung dieses ersten Reinigungsschrittes mittels Silberfärbung bzw. *western blot*:

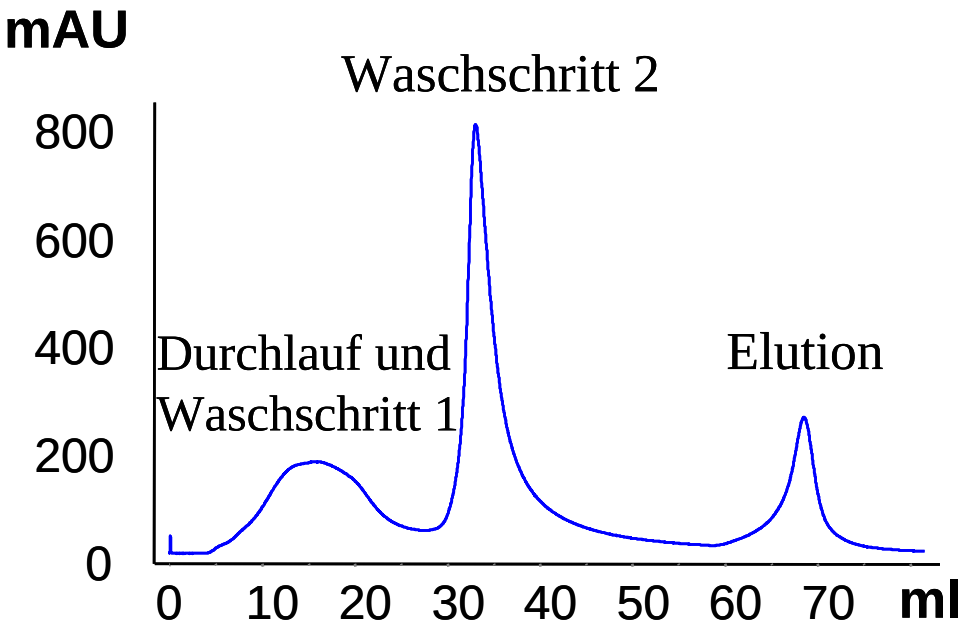


Abb.24: Chromatogramm der Heparinaffinitätschromatographie als erstem Reinigungsschritt in der Isolierung von CXCL10 – GPI. Auf der Abszisse ist das Volumen des mittels FPLC gewonnenen Eluats in ml aufgetragen, die Ordinate stellt dessen UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm als Maß für den Proteingehalt dar. Aufgetragen wurden 10 ml des Proteinextrakts. Nach initialem Durchlauf und erstem Wachschritt und einem Trennungsvorgang bei einer Salzkonzentration von 400 mM NaCl (Waschschritt 2), ist das gesuchte Proteinkonstrukt in der mit 1 M NaCl eluierten Fraktion (Elution) zu finden. Die Fraktionen des Eluats wurden gesammelt.

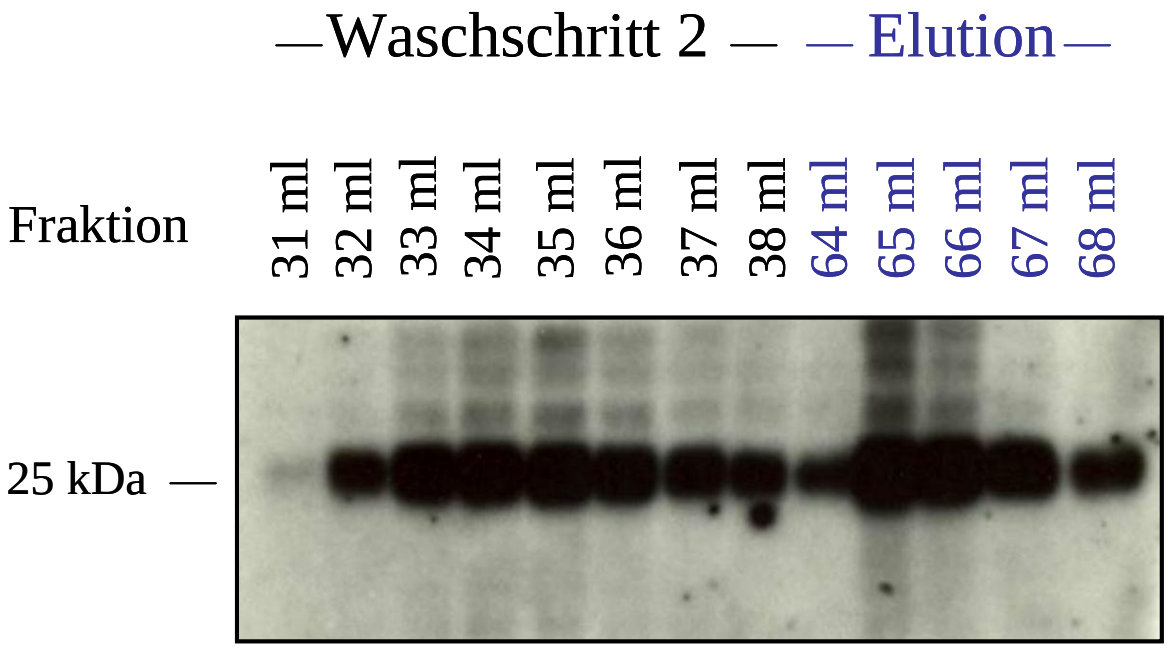


Abb.25: Analytischer *western blot* der Fraktionen der Heparinaffinitätschromatographie. Im Laufe der Chromatographie werden Einzelfraktionen mit einem Volumen von jeweils 1 ml gewonnen. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl der einzelnen Fraktionen des „Waschschritt2"- sowie des „Elution"-Peaks. Der dargestellte Blot zeigt den immunologischen Nachweis von CXCL10-GPI in jeder der aufgetragenen Fraktionen. Somit erfolgt bereits im ersten Schritt der Aufreinigung ein Verlust von CXCL10-GPI in der Waschfraktion.

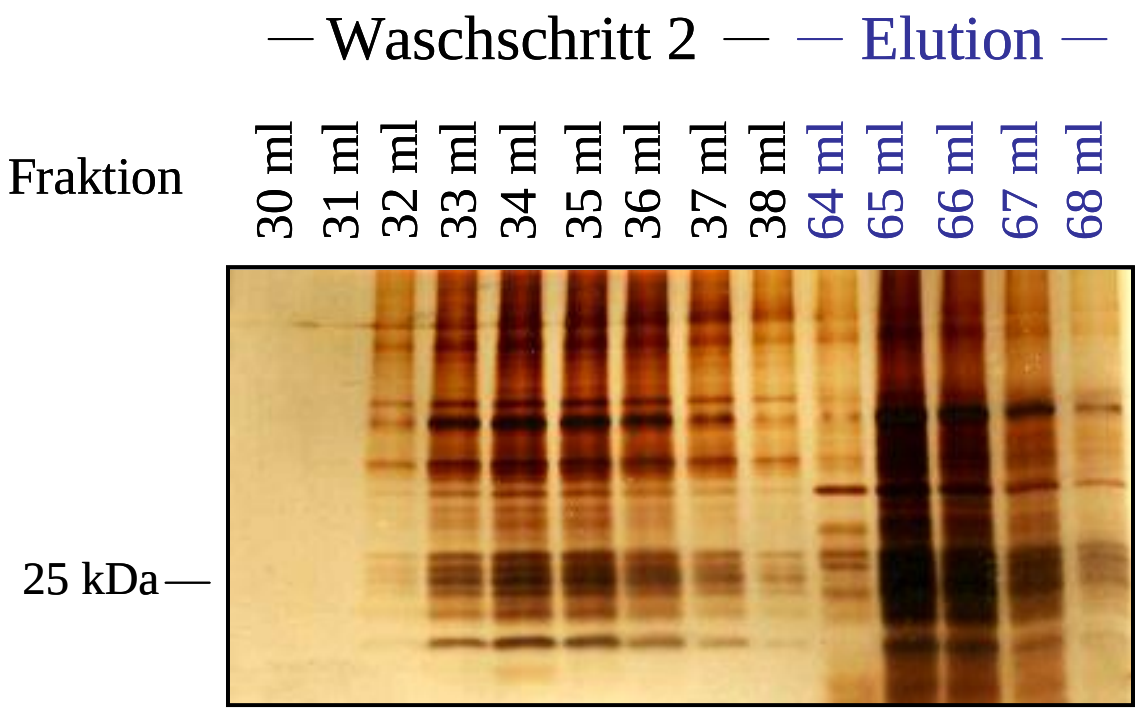


Abb.26: Silberfärbung der durch Heparinaffinitätsfiltration gewonnenen Einzelfraktionen. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl Einzelfraktionen des Chromatographielaufes. Dabei wurden zur Korrelation der Ergebnisse dieselben Einzelfraktionen wie beim in Abb. 25 gezeigten *western blot* verwendet. Die markierte Bande mit ca. 25 kDa entspricht dem CXCL10-GPI-Dimer. Konkordant zum Ergebnis der *western blot*-Analyse zeigt sich eine Nachweisbarkeit in allen Einzelfraktionen, bei allerdings geringerem Anteil von begleitenden Proteinen in den Eluatfraktionen.

CXCL10-GPI ist in allen untersuchten Fraktionen immunologisch in einer Größe von 25 kDA detektierbar, es ist somit im Verlauf der Heparinchromatographie zu einer Dimerisierung des Chemokins gekommen. In anderen Läufen konnten sowohl das Mono- und das Dimer als auch nur das Monomer nachgewiesen werden. Die Dimerisierung ist ein physiologisch vorkommender Prozess in der Chemokinchemie, in der Literatur oft beschrieben und ohne negativen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins.

In der Silberfärbung zeigen sich in sämtlichen Fraktionen neben CXCL10-GPI (Bande bei ca. 25 kDa) noch zahlreiche weitere Banden als Ausdruck der Anwesenheit anderer Proteine, wobei in den Fraktionen des Waschpeaks in Relation zu den Eluatfraktionen wesentlich zahlreichere Verunreinigungen nachzuweisen sind. Dies korreliert mit der höheren UV-Absorption im Chromatogramm als Ausdruck des Proteingehalts der Fraktionen. Die Reinigung ist qualitativ noch nicht ausreichend. Die Fraktionen des Waschpeaks wurden verworfen, die des Eluats weiterverwendet. Durch den ersten Schritt des Reinigungsprotokolls wird eine erste Purifikation von CXCL10-GPI erreicht, allerdings ist dies auch bereits mit einem Verlust des Proteins verbunden. Dem ist insofern Rechnung zu tragen, dass jeder weitere eingefügte Schritt zu einer zusätzlichen Verminderung der Proteinmenge führen kann.

AUFREINIGUNG VON CXCL10-GPI DURCH KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

Die GAG-Bindungsstellen des Proteins sind stark positiv geladen und besitzen daher eine starke Affinität gegenüber der stationären Phase einer Kationenaustauschsäule bzw. eine geringe Affinität gegenüber der stationären Phase einer Anionenaustauschsäule. Da der hochmolare Elutionspuffer der Heparinaffinitätschromatographie eine Bindung an die stationäre Phase dieser Säule erschweren würde, wurde er gegen einen niedermolaren Äquilibrierungspuffer (100mM NaCl) ausgetauscht. Die Fraktionen des Eluats der Heparinaffinitätschromatographie wurden auf die Kationenaustauschsäule geladen. Das Protein konnte bei 800 mM NaCl eluiert werden. Die Fraktionen wurden mittels Silberfärbung und *western blot* analysiert.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse:

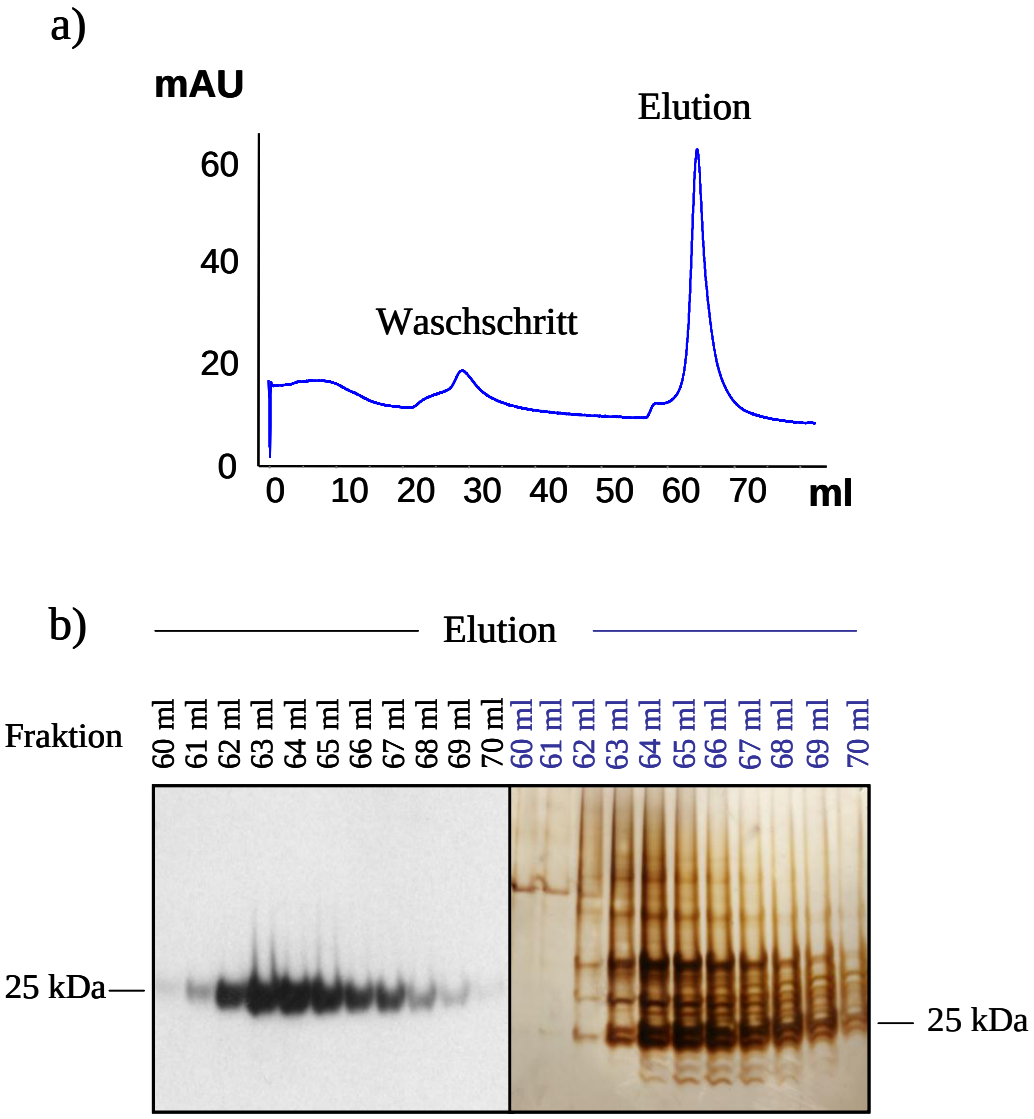


Abb.27: Chromatogramm (a, oben), *western blot* und Silberfärbung (b, unten) der Kationenaustauscherchromatographie von CXCL10-GPI.

a) Chromatogramm eines repräsentativen Reinigungslaufes. Aufgetragen auf die Chromatographiesäule wurden nach einem Umpufferungsschritt die als „Elution“ gekennzeichneten Fraktionen der Heparinchromatographie. Nach einem ersten Reinigungsschritt mit einer Salzkonzentration von 300 mM (Waschschritt) befindet sich in der anschließenden Elutionsstufe mit 800 mM NaCl das gesuchte Proteinkonstrukt CXCL10–GPI.
b) Die Fraktionen des Eluats wurden gesammelt**.** Der *western blot* zeigt den immunologischen Nachweis des CXCL10-GPI-Dimers, die Silberfärbung die dazu korrelierende Bande bei 25 kDa.

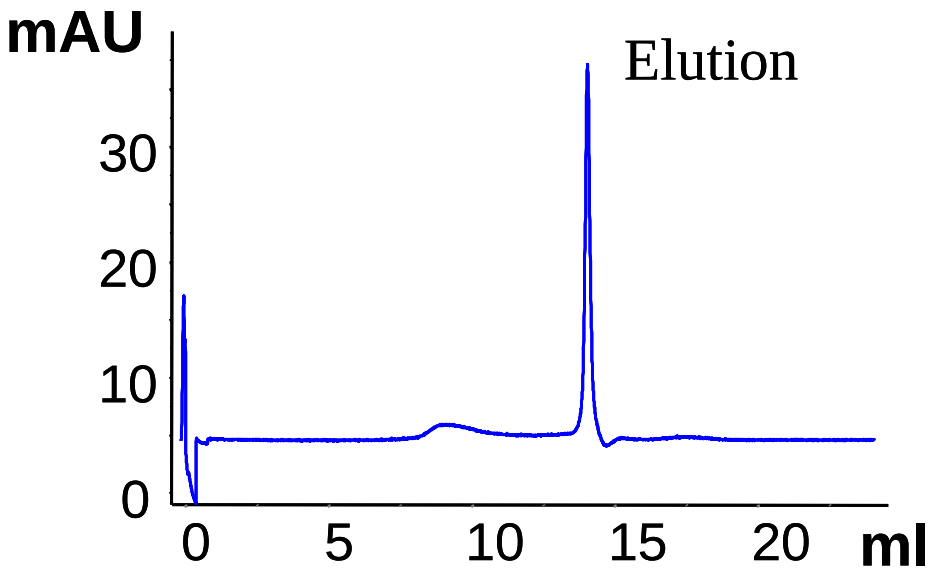
Immunologisch kann CXCL10-GPI als Dimer in allen Eluatfraktionen nachgewiesen werden, in der Silberfärbung zeigt sich eine deutliche Aufreinigung: In allen Fraktionen sind eindeutig weniger Nebenbanden als Korrelat begleitender unerwünschter Proteine nachweisbar.

AUFREINIGUNG VON CXCL10-GPI DURCH GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE

Nachdem die ersten beiden Reinigungsmethoden vor allem ladungsbedingte Affinitätsunterschiede der verschiedenen Proteine ausnutzten, wurde im dritten Schritt der Aufreinigung von CXCL10-GPI eine Trennung aufgrund unterschiedlicher geometrischer Größen der restlichen verbliebenen Proteine durchgeführt. Pro Lauf wurden hierbei 700 µl des gesammelten Eluats der SP-Sepharose-Säule auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und über eine isokratische Elution mit entsprechendem Puffer aufgetrennt. Als Fraktionen wurden hier Volumina von 250 µl aufgefangen und mittels *western blot* und Silberfärbung hinsichtlich ihres CXCL10-GPI-Gehaltes untersucht.

Das Chromatogramm eines repräsentativen Laufes zeigt Teil a) der folgenden Abbildung, im Teil b) sind erneut die Ergebnisse von *western blot* und Silberfärbung dargestellt.

a)



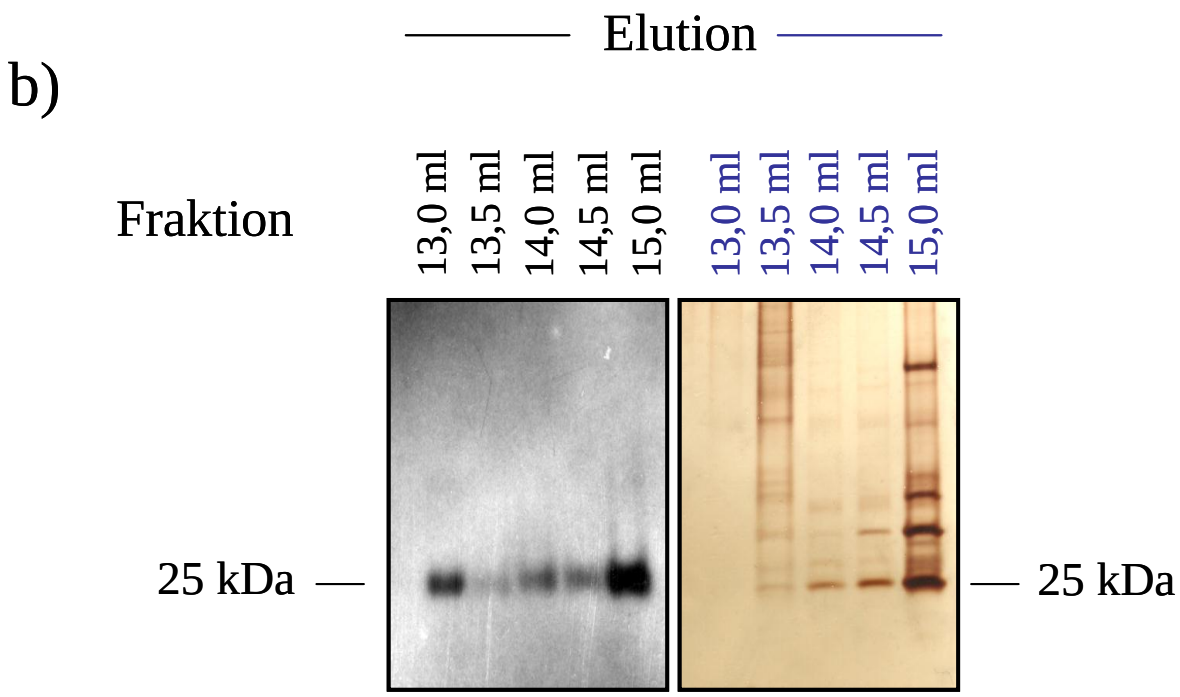


Abb.28: Chromatogramm (a, oben), *western blot* und Silberfärbung (b, unten) einer Gelfiltrationschromatographie von CXCL10-GPI.
a) Chromatogramm eines repräsentativen Reinigungslaufes Dargestellt ist auf der Abszisse das elutierte Volumen. Auf der Ordinate ist die UV-Absorption von Licht einer Wellenlänge von 280 nm aufgetragen. Nach Auftrag von jeweils 700 µl des Kationenaustauschersäulen-Eluats befindet sich CXCL10–GPI in dem großen Peak.
b) Wiederum wurden die Fraktionen des Eluats gesammelt**.** Der *western blot* zeigt den immunologischen Nachweis des CXCL10-GPI-Dimers, die Silberfärbung die dazu korrelierende Bande bei 25 kDa.

Zusätzlich wurden nach Ablauf des gesamten Reinigungsprotokolls repräsentative Einzelfraktionen der einzelnen Reinigungsschritte zum Nachweis von CXCL10-GPI sowie zur Darstellung des Reinigungsprozesses mittels *western blot* und Silberfärbung analysiert.

Dabei war im *western blot* in allen Fraktionen CXCL10-GPI detektierbar. Die in manchen Isolierungsvorgängen zu beobachtende –und auch unter physiologischen Bedingungen ablaufende- Dimerisierung des Proteins spielte dabei keine Rolle und beeinträchtigte die Funktion des Chemokins nicht (Abbildung 29).

Wie man in der Silberfärbung erkennen kann, befinden sich nach dem finalen Reinigungsschritt zwar noch geringgradige Verunreinigungen in den isolierten Proteinfraktionen, die Reinheit und –davon abhängig- wirklich eingesetzte Menge humanen CXCL10-GPIs sollten jedoch für die folgenden *in vitro* Versuche ausreichen (Abbildung 30).

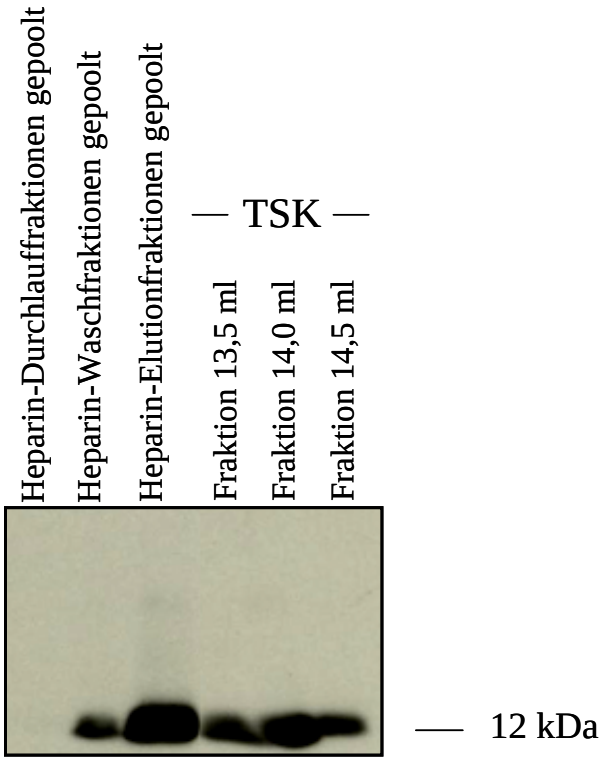


Abb. 29: Analytischer *western blot* zum Nachweis von CXCL10 GPI. Zur Korrelation mit der in Abb. 30 gezeigten Silberfärbung wurden 5 µl derselben Fraktionen des Isolierprozesses zum immunologischen Nachweis aufgetragen. Abgesehen vom Heparin-Durchlauf ist in allen Fraktionen das CXCL10-Monomer detektierbar.

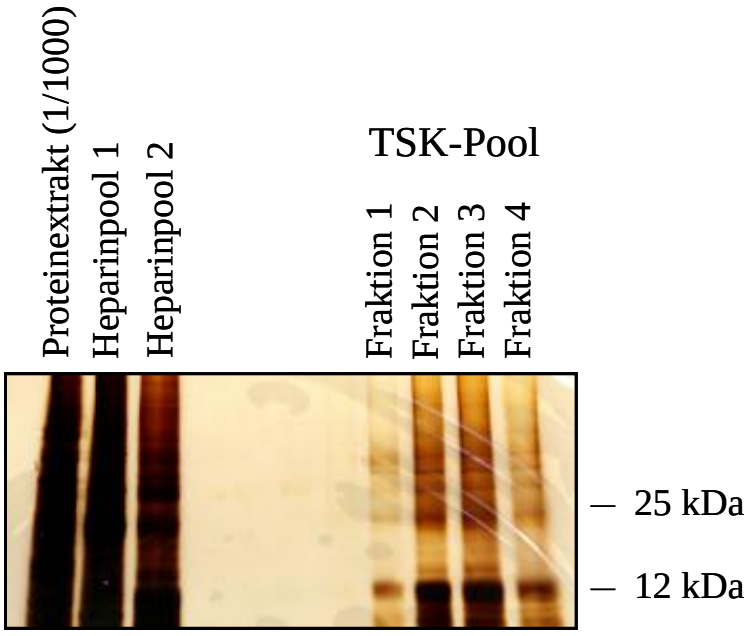


Abb. 30: Silberfärbung repräsentativer Einzelfraktionen verschiedener Reinigungsschritte von CXCL10-GPI. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl von den Proteinfraktionen aus dem initialen Extrakt (zuvor 1/1000 verdünnt), der Heparinchromatographie sowie der TSK-Gelfiltration. Humanes CXCL10 ist in den Fraktionen der TSK-Chromatographie (rechts) sowohl als Monomer (12kDa) als auch als Dimer (25kDa) relativ rein nachweisbar**.**

Abschließend soll der gesamte bisher beschriebene Prozess in einer Tabelle dargestellt werden:

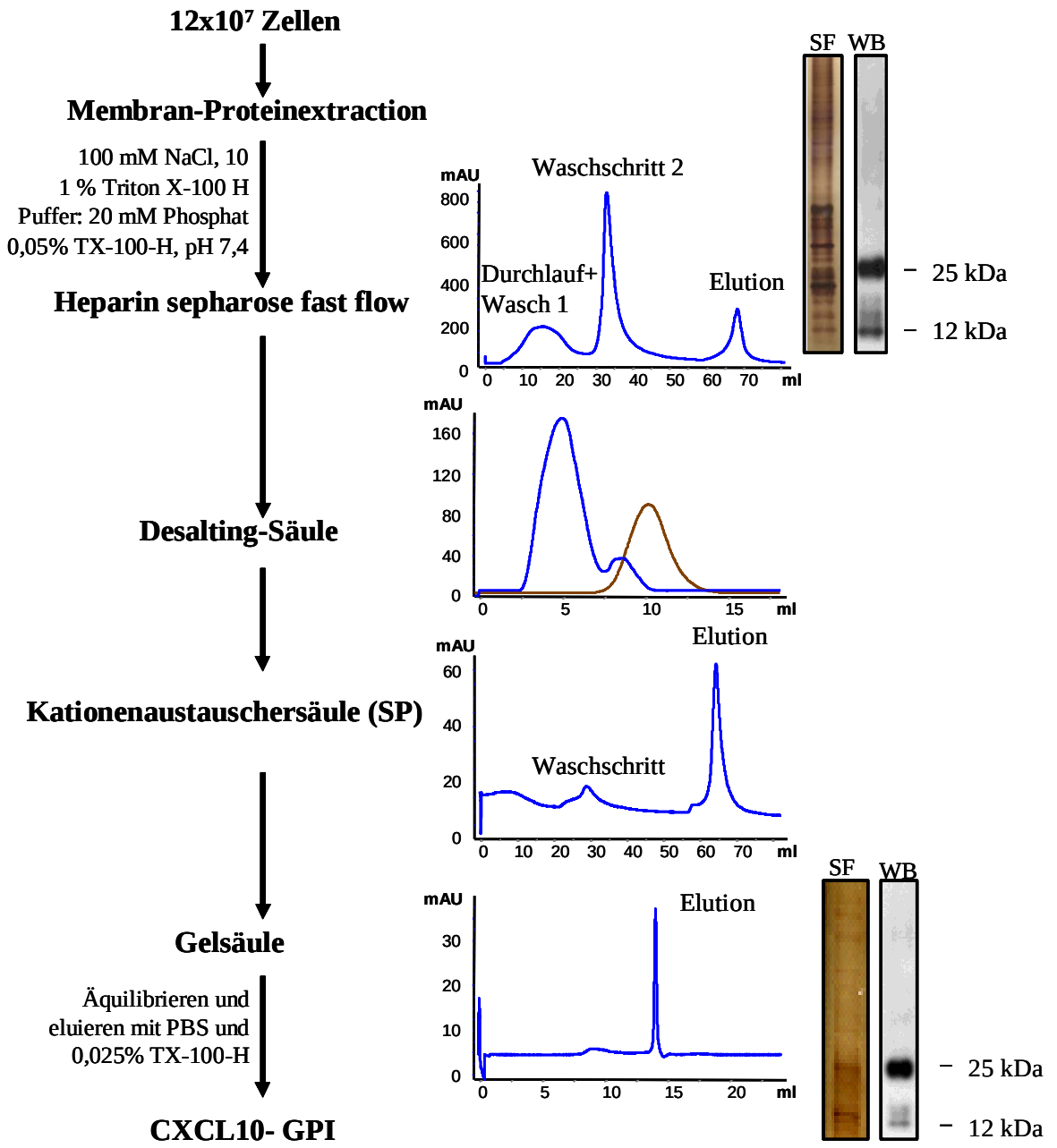


Abb. 31: Übersichtstabelle der Aufreinigung von CXCL10-GPI. Der gesamte Aufreinigungsprozess vom CXCL10-GPI mittels der Methoden der Chromatographie in einer tabellarischen Zusammenschau. 12 x 10^7 Zellen wurden mit 7,5 ml Membranextraktionspuffer lysiert. Der Überstand wurde dann auf die Heparin-Säule aufgetragen. Die Fraktionen wurden mittels *western blot* und Silberfärbung untersucht, die CXCL10-GPI enthaltenden Fraktionen des Elutionspools wurden nach Umpufferung (Desalting-Säule) auf die Kationenaustauschersäule aufgetragen. Die gewonnenen Fraktionen wurden wiederum mittels Silberfärbung und *western blot* analysiert und die als Elution bezeichneten Fraktionen auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, um eine weitere Aufreinigung zu erreichen. Wie im *western blot* und in der Silberfärbung zu sehen, findet während des Reinigungsprozesses eine Dimerisierung des Proteins statt, so dass sowohl Monomer (ca. 12 kDa) als auch Dimer (ca. 25 kDa) nachzuweisen sind.

BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION UND DER AUSBEUTE

Um die Konzentration von CXCL10-GPI zu ermitteln, wurde, nachdem Detektionsprobleme bei der Methode nach Bradford aufgetreten waren, ein ELISA durchgeführt.

Als Negativkontrollen dienten dabei Fraktionen, in denen per *western blot* kein CXCL10-GPI nachgewiesen werden konnte, als Positivkontrolle wurde rekombinantes humanes CXCL10 benutzt. Von der ursprünglich eingesetzten Menge von CXCL10 konnten 10 % isoliert werden. In absoluten Zahlen sind dies ca. 8 ng (Addition der gesammelten TSK-Fraktionen, Konzentration: 2,2 ng/ml) gereinigtes Protein aus 78,3 ng, die sich zu Beginn im Proteinextrakt befanden. Während nach Affinitätschromatographie 82% (64 ng) und nach Kationenaustauschchromatographie 45% (35,5 ng) der ursprünglich eingesetzten Proteinmenge nachzuweisen sind, wird ein großer Verlust an Protein durch die Gelfiltration hervorgerufen: Während nach Kationenaustauschchromatographie noch 35,5 ng CXCL10-GPI vorhanden sind, gehen 78% dieser Proteinmenge während des anschließenden Reinigungsschrittes verloren. Als Ursache kommt am ehesten eine Oligomerisierung des Proteins in Frage, die die Elution von der Säule verhindert.

Als generelles Problem ist die bereits initial geringe Proteinmenge zu nennen.

INCORPORIERUNG VON CXCL10-GPI IN DIE ZELLMEMBRAN

In der klinischen Anwendung soll das isolierte Chemokinkonstrukt über den GPI-Anker in die Membran von Gefäßendothelzellen integriert werden. Ein reines Protein ohne auch nach der Isolierung unverändert bestehende Funktionalität des Membranankers ist schlussendlich wertlos.

Daher wurde zur Überprüfung die *in vitro* Reinkorporierung von CXCL10-GPI Protein in Zellmembranen von mikrovaskulären Endothelzellen (HDBEC) simuliert. Die Zellen wurden mit 50 µl des Heparin- (800 pg CXCL10-GPI), Desalting- (450 pg CXCL10-GPI) sowie 100 µl des TSK-Pools (250 pg CXCL10-GPI) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, gegen CXCL10 gefärbt und in der FACS-Analyse untersucht. Zusätzlich wurden eine reine Pufferkontrolle ohne Protein sowie als Negativkontrolle 50 ng rekombinantes hCXCL10 in 50 µl Puffer analysiert. In parallelen Ansätzen wurde nach Inkubation mit dem jeweiligen Chemokin 120 ng/ml Phospholipase-C (PLC) zu den Zellen gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurde auch hier gegen CXCL10 gefärbt. Es wurde als primärer Antikörper ein polyklonaler Antikörper gegen CXCL10 verwendet, da ein monoklonaler in entsprechenden Vorversuchen kein Signal gezeigt hatte.

Abbildung 32 zeigt die entsprechenden Versuchsergebnisse.

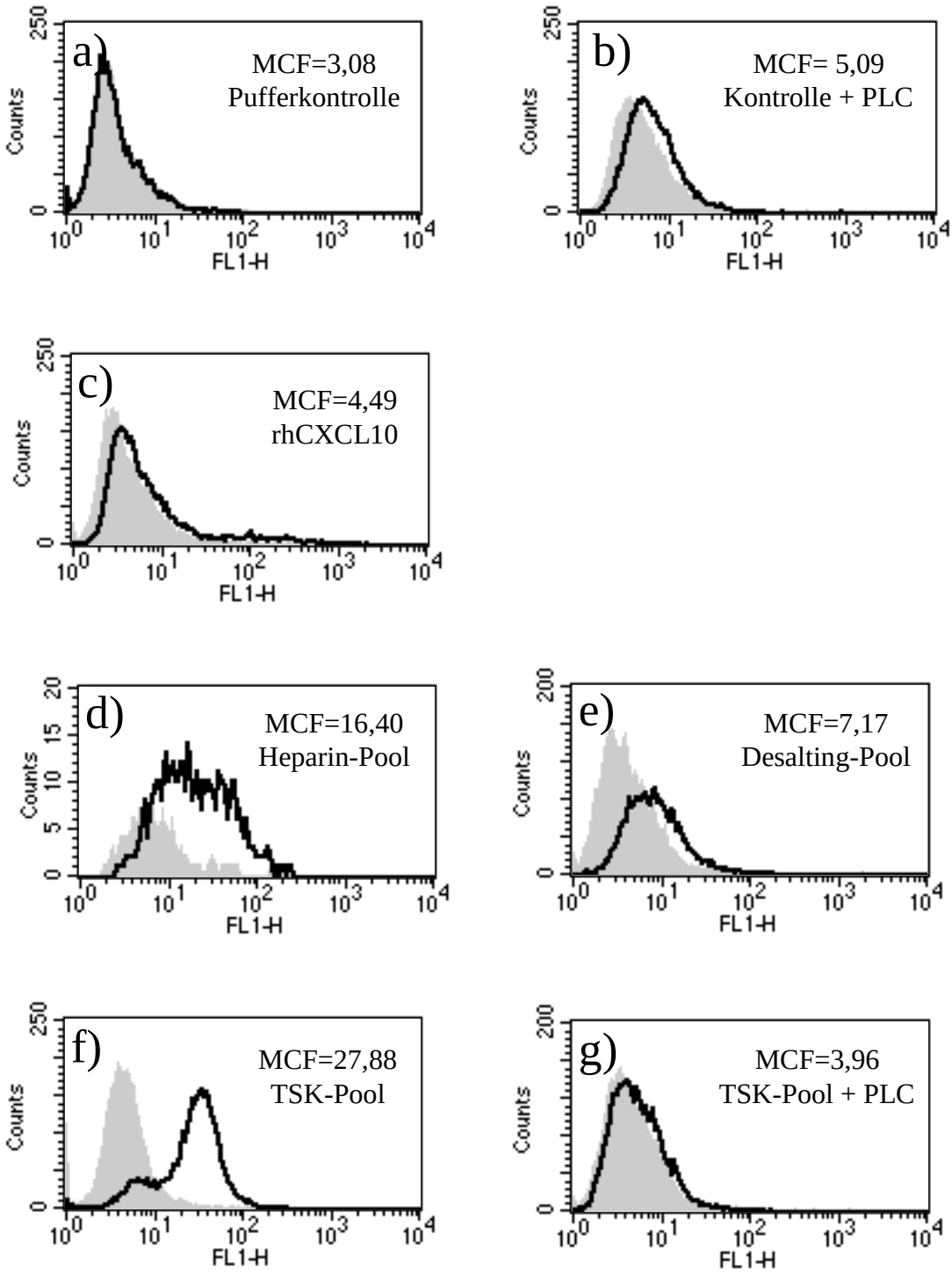


Abb.32: FACS-Analyse der Reinkorporierung von CXCL10-GPI in HDBEC-Zellen. HDBEC-Zellen in 50 µl Medium ohne FBS pro Ansatz wurden mit 50 µl Puffer, Heparin-, Desalting- sowie 100 µl TSK-Pool oder 50 ng rekombinanten CXCL10 in 50 µl TSK-Puffer inkubiert. In parallelen Ansätzen wurde dann 120 ng/ml Phospholipase-C (PLC) zu den Zellen gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CXCL10 oder der entsprechenden Isotypkontrolle sowie einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt und mittels FACS analysiert. 5 x 10^4 Zellen wurden ausgewertet. Die vom Programm *CellQuest* erstellten Diagramme aus Isotypkontrollfärbung (grau hinterlegt) und anti-hCXCL10-Färbung (schwarze Linie) wurden übereinander gelegt.
a) und **b)** Pufferkontrolle **a)** ohne und **b)** mit Zugabe von Phospholipase-C
c) Rekombinantes humanes CXCL10
d) Heparinpool (1. Aufreinigungsschritt)
e) Desalting-Pool (Zwischenschritt)

f) und **g)** TSK-Pool (finaler Reinigungsschritt) **f)** ohne und **g)** mit Zugabe von Phospholipase-C. Während nach Inkubation von HBEC-Zellen mit 100 µl des TSK-Pools eine Oberflächenexpression von CXCL10 detektierbar ist, kann man nach Zugabe von PLC-C kein Signal mehr erkennen. Dies spricht für a) das Vorhandensein von CXCL10-GPI im TSK-Pool, welches durch den GPI-Anker in die Zellmembranen inkorporiert wird und b) die Unversehrtheit des Membran-Ankers. Durch Zugabe der Lipase wird der Anker geschnitten, die Bindung von CXCL10 ist nicht mehr nachweisbar.

Bei den lediglich mit Versuchspuffer oder rekombinantem humanen CXCL10 inkubierten HDBEC-Zellen ist kein Unterschied zwischen dem Kurvenverlauf der Isotypkontrolle und dem des Ansatzes mit dem spezifischen Antikörper gegen CXCL10 zu erkennen. Erwartungsgemäß kann in diesen Versuchsansätzen auf der Oberfläche der Endothelzellen aufgrund mangelnden Proteins (im Falle des nur den Puffer enthaltenden Ansatzes) oder mangelnder Membranverankerung (im Falle des rekombinanten CXCL10) kein CXCL10 nachgewiesen werden. Bei Einsatz der Eluate der unterschiedlichen Chromatographieschritte hingegen zeigt sich eine Oberflächenexpression von CXCL10-GPI, die bei Inkubation der Endothelzellen mit den Heparin-Fraktionen ausgeprägter als bei Verwendung der Desalting-Fraktionen ist. Dies lässt sich am ehesten mit der bei der Inkubation mit dem Heparin-Eluaten größeren Menge eingesetzten CXCL10-GPI erklären. Der deutlichste Effekt bei Inkubation mit den gesammelten Fraktionen der Gelfiltration dagegen ist - trotz der geringsten CXCL10-GPI-Menge - am ehesten durch den größeren Reinheitsgrad des Proteins und der damit verbundenen geringeren Anzahl von Interaktionen von CXCL10-GPI mit anderen Begleitproteinen zu erklären. Zusätzlich kommt es wegen geringerer Interferenzen dieser mit den Antikörpern zu einer weniger erschwerten Bindung an das eigentliche Zielepitop.

Nach Behandlung mit 120 ng/ml Phospholipase-C verschwindet die in allen Proben nachweisbare Oberflächenverankerung des Chemokinkonstrukts fast vollständig. Da Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C den Membrananker zwischen dem Phosphatrest des Inositols und dem Diglyceridrest spalten kann und somit zu einer Loslösung des zuvor gebundenen Proteins führt, kann durch die Reduktion des Fluoreszenzsignals die Intaktheit des GPI-Ankers angenommen werden.

AUFREINIGUNG VON MUCIN CXCL10 – GPI MITTELS FPLC

Nachdem die Isolierung des GPI-verankerten CXCL10–Konstruktes gelungen und die *in vitro* Wirksamkeit der Verankerung im Rahmen der Reinkorporierungsversuche demonstriert werden konnte, wurde ein Reinigungsprotokoll für mucin CXCL10-GPI erarbeitet. Aufgrund der auch hier zu erwartenden Bindung an eine Heparin - Affinitätssäule stellte diese das erste Mittel im Reinigungsverfahren dar:

AUFREINIGUNG VON MUCIN CXCL10 - GPI DURCH HEPARIN–AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Auch hier wurden 12 x 10^7 mit mucin CXCL10-GPI transfizierte Zellen (CHO-mucin IP10-GPI) nach Inkubation in einem hypertonischen Puffer mit 10 ml Extraktionspuffer lysiert. Großer Zelldetritus wurde wiederum mittels Zentrifugation sediert; der gewonnene, das Proteinkontrukt enthaltene Überstand nach Filtration auf eine zuvor äquilibrierte Heparin *HiTrap*–Säule aufgetragen. Über den Zwischenschritt eines linearen Elutionsgradienten wurde ein Zwei-Stufen–Elutions-Protokoll entwickelt, wobei nach einem initialen Waschschritt mit 100 mM NaCl und einem ersten Reinigungsschritt mit 400 mM Salzkonzentration die eigentliche Elution mit 1 M NaCl erfolgte. Sämtliche Fraktionen wurden mittels *western blot* und Silberfärbung analysiert. Das folgende Chromatogramm stellt zunächst einen repräsentativen Lauf graphisch dar:

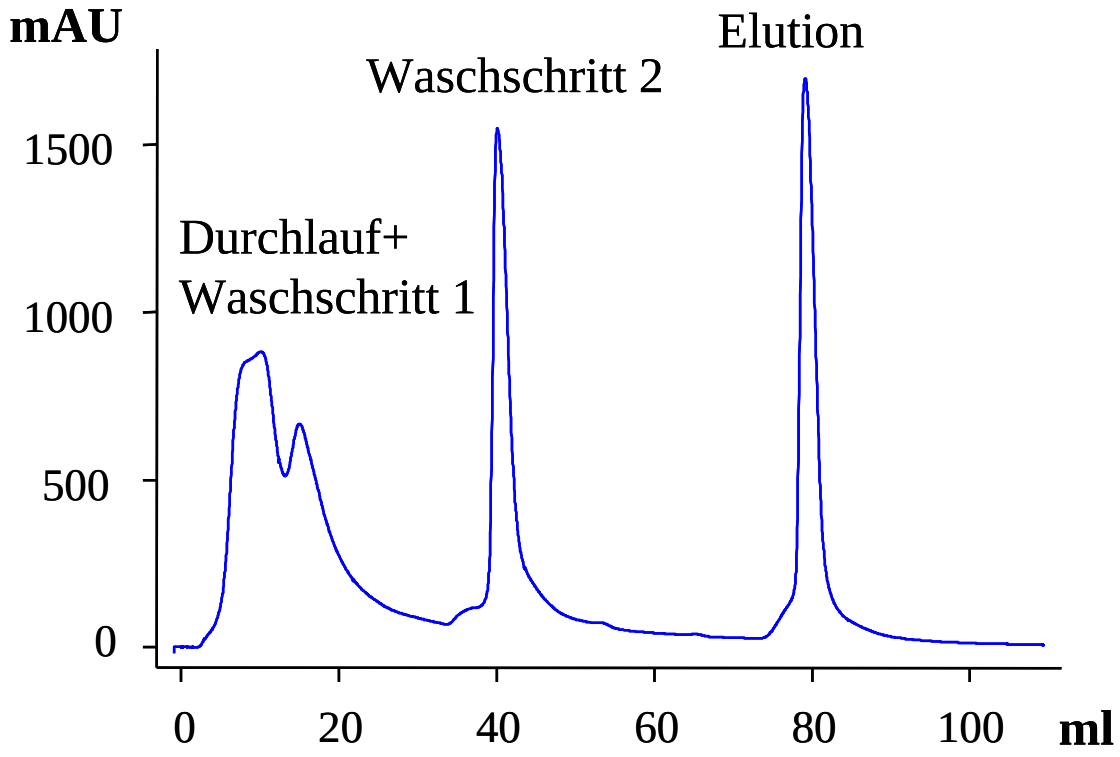


Abb.33a): Chromatogramm der Heparinaffinitätschromatographie von mucin CXCL10 – GPI. Auf der Abszisse ist das Volumen des mittels der FPLC gewonnenen Eluats in ml aufgetragen, die Ordinate stellt dessen UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm als Maß für den Proteingehalt dar. Aufgetragen wurden 10 ml Proteinextrakt. Nach initialem Wachschritt und einem Trennungsvorgang bei einer Salzkonzentration von 400mM NaCl, ist das gesuchte Proteinkonstrukt in der mit 1 M NaCl eluierten Fraktion zu finden (mit „Elution" markierter Peak).

In Analogie zu dem bereits erarbeiteten Reinigungsprotokoll wurden die Waschfraktionen verworfen und die als Eluat bezeichneten Fraktionen vereinigt. Man entschied sich auch hier für die Kationenaustauschchromatographie als zweiten Schritt.

AUFREINIGUNG VON MUCIN CXCL10-GPI DURCH KATIONENAUSTAUSCHERCHROMATOGRAPHIE

Wiederum wurde dem eigentlichen Auftrennungsprozess eine Umsalzung der zuvor gepoolten Fraktionen vorangestellt. Über den Zwischenschritt eines linearen Elutionsgradienten wurde ein Zwei-Stufen–Elutions-Protokoll entwickelt, wobei nach einem initialen Waschschritt mit 100 mM NaCl und einem ersten Reinigungsschritt mit 400 mM Salzkonzentration die eigentliche Elution mit 650 mM NaCl erfolgte. Sämtliche Fraktionen wurden mittels *western blot* und Silberfärbung analysiert. Abbildung 33b illustriert den Reinigungsschritt:

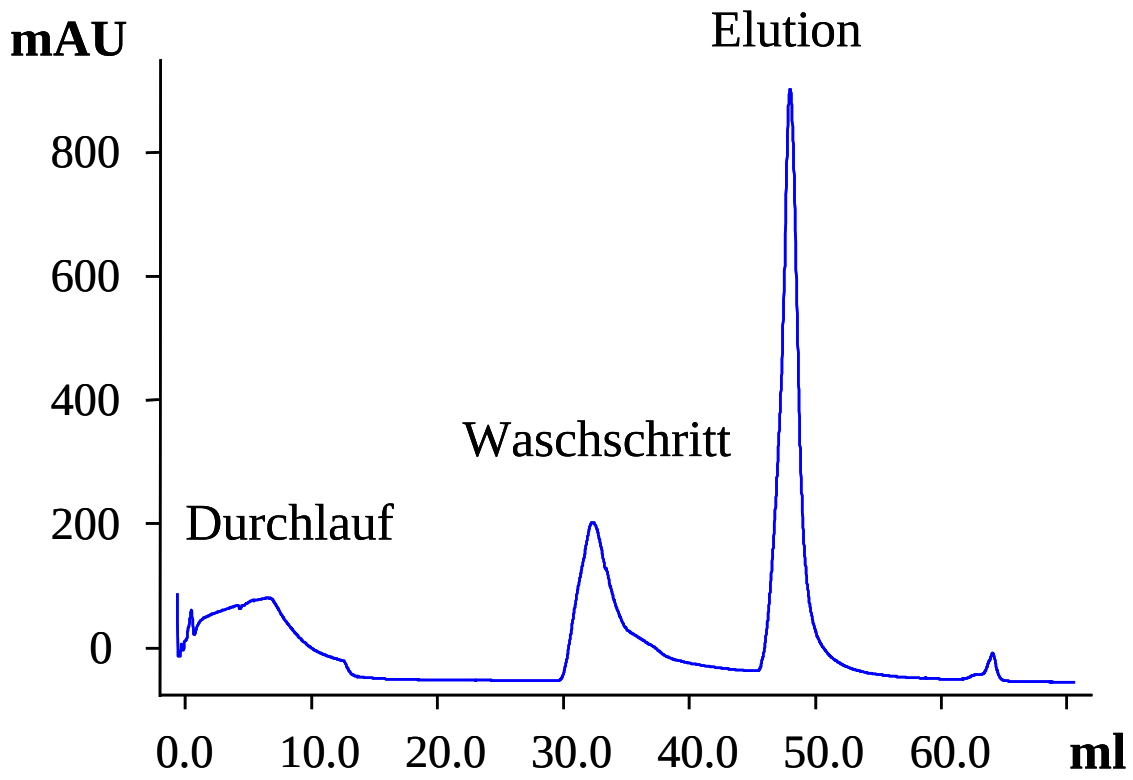


Abb.33b): Chromatogramm der SP-Kationenaustauschchromatographie von mucin CXCL10–GPI. Aufgetragen wurde das gesammelte Eluat der Heparinchromatographie nach Umpufferung. Nach einem initialen Waschschritt mit einer Konzentration von 100 mM NaCl (Durchlauf) erfolgt ein erster Reinigungsschritt mit einer Salzkonzentration von 300 mM (Wachschritt). In der anschließenden Elutionsstufe mit 650 mM NaCl befindet sich das gesuchte Proteinkonstrukt mucin CXCL10 – GPI (Elution).

Nach diesen primären Reinigungsschritten wurde initial auch eine weitere Aufreinigung unter Verwendung der Gelfiltrationschromatographie versucht. Allerdings konnte nach den jeweiligen Läufen mucin CXCL10–GPI nicht mehr nachgewiesen werden, so dass im Folgenden auf diesen Protokollschritt verzichtet wurde. Die analytischen Daten, die nach den jeweiligen Reinigungsschritten mit der Kationenaustauschchromatographie gewonnen werden konnten, sollen die folgenden Abbildungen illustrieren:

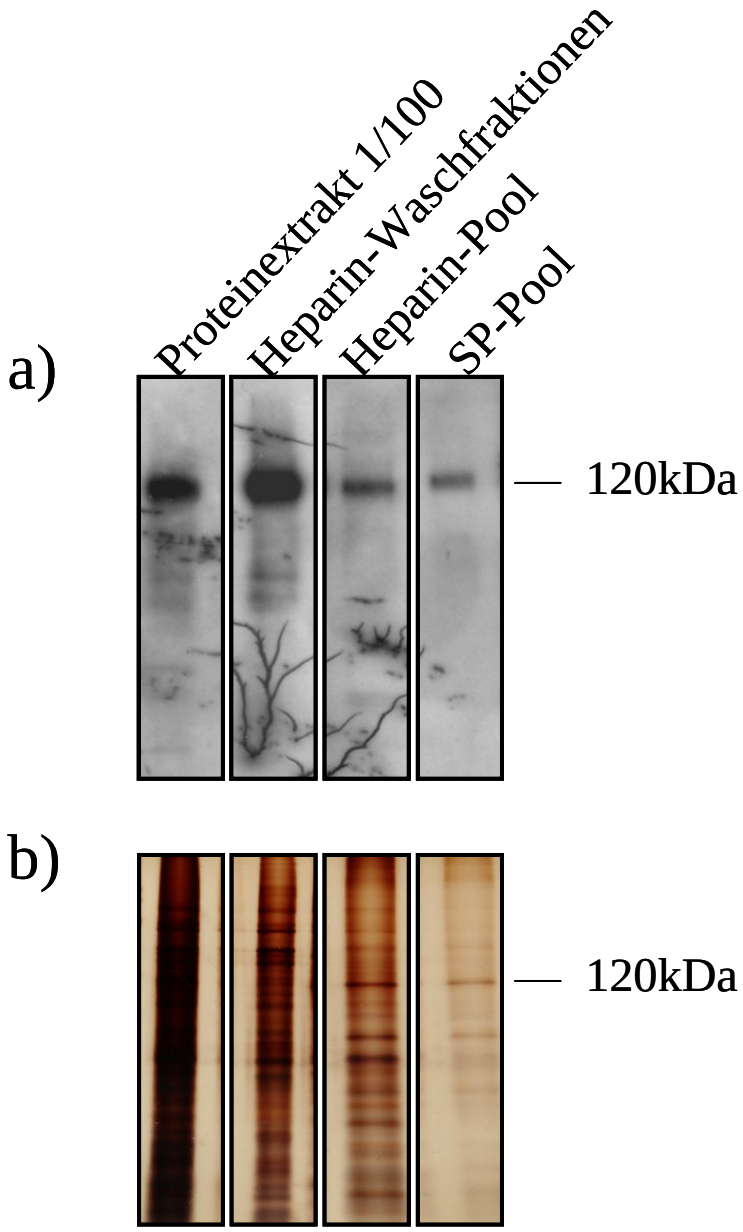


Abb.34: Analyse des Reinigungsprozesses von mucin CXCL10-GPI mittels *western blot* (a, oben) und Silberfärbung (b, unten) Zur Analyse des Reinigungsprozesses sowie zum immunologischen Nachweis von mucin CXCL10-GPI wurden nach sämtlichen Einzelschritten die jeweiligen Proteinpoole mittels Silberfärbung und western blot analysiert.
a) Für den *western blot* wurden je Fraktion 5 µl des jeweiligen Pools verwandt. Auch hier ergibt sich für dieselbe Molekulargröße ein deutliches Signal.

b) Für die Silberfärbung wurden jeweils 5 µl des jeweiligen Pools eingesetzt, wobei der Proteinextrakt zuvor um den Faktor 1000 mit PBS-Puffer verdünnt wurde. Die detektierbare Bande bei 120 kDa entspricht dem mucin CXCL10-GPI-Dimer.

In allen analysierten Fraktionen ist mucin CXCL10-GPI immunologisch als Dimer in einer Größe von ca. 120 kDa nachweisbar. Wie bei der Isolierung von CXCL10-GPI ist es im Rahmen des Reinigungsprotokolls zu einer Oligomerisierung gekommen, diese ist hinsichtlich der Funktionalität des Proteins auch hier ohne Relevanz. Die Bildung noch größerer Oligomere auf der Gelfiltrationssäule könnte in Analogie zu CXCL10-GPI jedoch den völligen Verlust des Mucin-Konstruktes im Rahmen dieses Reinigungsschrittes erklären.

In der Silberfärbung ist konkordant zum *western blot* eine Proteinbande bei 120 kDa erkennbar. Im Vergleich zum initialen Proteingemisch kann eine deutliche Aufreinigung von mucin CXCL10-GPI dargestellt werden, auch wenn aufgrund nur zweier durchgeführter Schritte der Reinheitsgrad geringer als bei CXCL10-GPI ist. Dies ist bei der Interpretation der folgenden Experimente zu berücksichtigen, da ein möglicher Effekt der Nebenproteine nicht mit endgültiger Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Auch hier die gesamte Aufreinigung noch einmal in einer Übersichtsdarstellung:

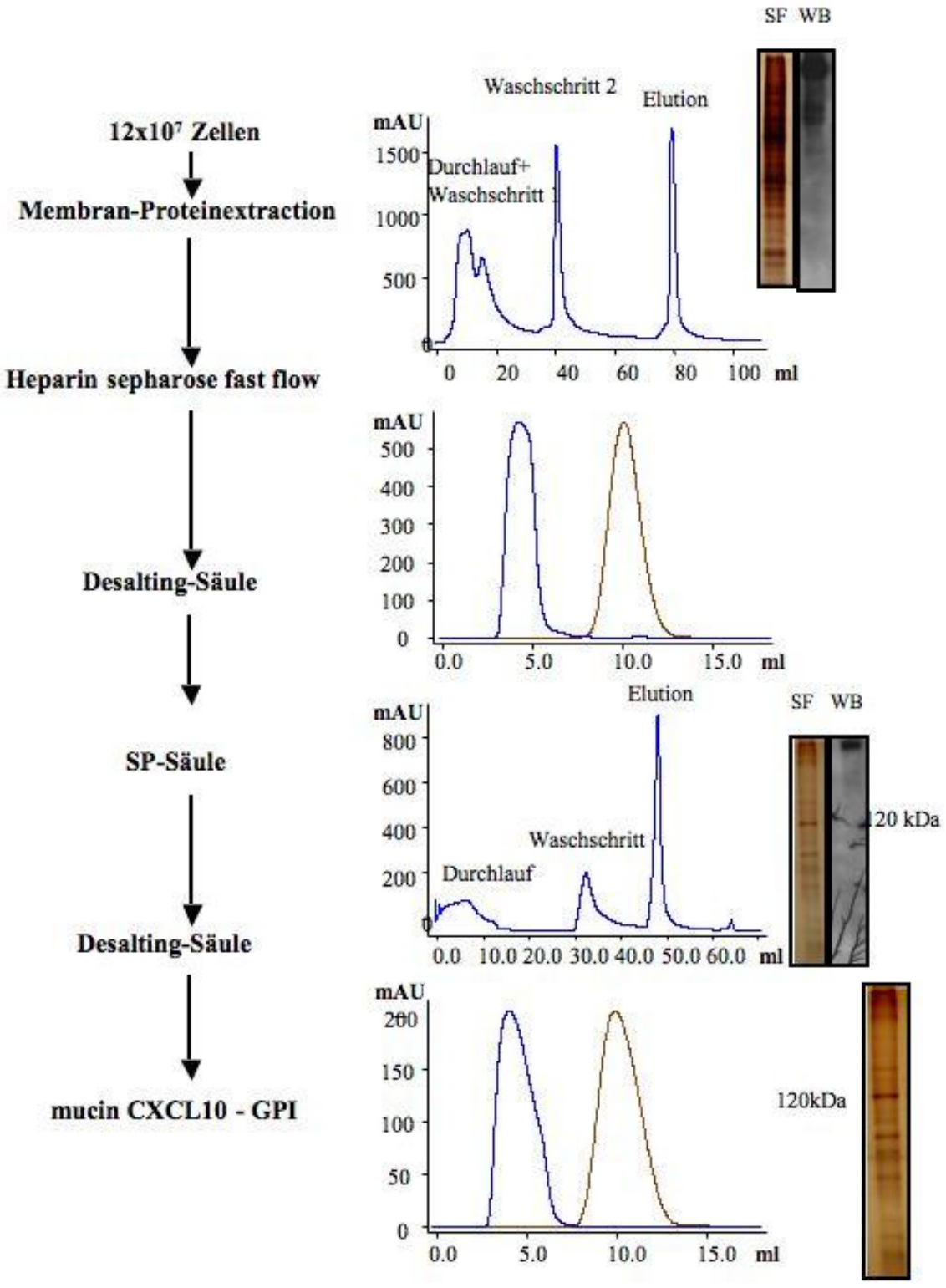


Abb.35: Aufreinigungstabelle von mucin CXCL10-GPI. Der gesamte Aufreinigungsprozess von mucin CXCL10-GPI mittels der Methoden der Chromatographie in einer tabellarischen Zusammenschau. 12 x 10^7 Zellen wurden mit 7,5 ml Membranextraktionspuffer lysiert, der Überstand dann auf die Heparin-Säule aufgetragen. Die Fraktionen wurden mittels *western blot* und Silberfärbung untersucht, die mucin CXCL10-GPI enthaltenden Fraktionen des Elutionspools wurden nach Umpufferung (Desalting-Säule) auf die Kationenaustauschersäule aufgetragen. Sämtliche Fraktionen wurden wiederum mittels Silberfärbung und *western blot* analysiert und die als Elution bezeichneten Fraktionen erneut umgepuffert, um für weitere Versuche

zur Verfügung zu stehen. Wie im *western blot* und in der Silberfärbung zu sehen, polymerisiert mucin CXCL10-GPI während des Reinigungsprozesses und ist in einer ungefähren Größe von 120 kDa nachzuweisen.

BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION UND DER AUSBEUTE

Aufgrund sehr geringer Mengen des aufgereinigten Proteins konnte eine valide Bestimmung der Konzentration sowie der Ausbeute nicht durchgeführt werden.

INCORPORIERUNG VON MUCIN CXCL10-GPI IN DIE ZELLMEMBRAN MIKROVASKULÄRER ENDOTHELZELLEN

Obwohl man nur von sehr geringen Mengen isolierten Proteins ausgehen konnte, sollte dennoch auch für dieses Konstrukt die *in vitro* Reinkorporierungsfähigkeit in Zellmembranen von mikrovaskulären Endothelzellen (HDBEC) überprüft werden. Aufgrund des schwierigen biologischen Verhaltens der HDBEC-Zellen unter Kulturbedingungen wurde nur das Protein nach dem finalen Reinigungsschritt untersucht und mit einer Pufferkontrolle verglichen. Die Zellen wurden analog dem Vorgehen bei CXCL10-GPI mit jeweils 100 µl des SP-Pools oder Puffer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend gegen CXCL10 gefärbt und in der FACS-Analyse untersucht. Auf eine Analyse mittels PLC-Verdau wurde hier aufgrund des schon bewiesenen Prinzips verzichtet.

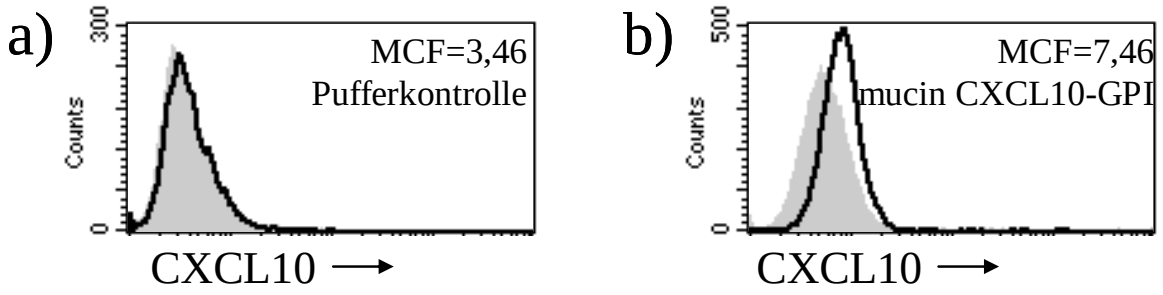


Abb.36: FACS-Analyse der Reinkorporierung von mucin CXCL10-GPI in HDBEC-Zellen. HDBEC-Zellen in 50 µl Medium ohne FBS pro Ansatz wurden mit 100 µl Puffer oder SP-Pool inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CXCL10 oder der entsprechenden Isotypkontrolle sowie einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt und mittels FACS analysiert. 5 x 10^4 Zellen wurden ausgewertet. Die vom Programm *CellQuest* erstellten Diagramme aus Isotypkontrollfärbung (grau hinterlegt) und anti-hCXCL10-Färbung (schwarze Linie) wurden übereinander gelegt.
a) Pufferkontrolle
b) mucin CXCL10-GPI

Auch wenn keine genaue Proteinbestimmung für die eingesetzte Menge von mucin CXCL10-GPI erfolgen konnte, zeigt sich doch auch hier eine Oberflächenexpression von CXCL10. Die

Chemokin-Domäne wurde durch den Isolierungsprozess nicht zerstört, die Mucin-Domäne scheint die Bindung des Antikörpers nicht negativ zu beeinflussen.

ANALYSE DER CHEMOKINREZEPTOREXPRESSION AUF DER ZELLMEMBRAN VERSCHIEDENER LEUKOZYTENZELLLINIEN

Um für die geplanten Zelladhäsionsversuche eine Leukozytenzelllinie mit einem geeigneten Chemokinrezeptorprofil, d.h. mit einer möglichst hohen Oberflächenexpression des CXCL10-Rezeptors CXCR3, verwenden zu können, wurden 5 x 10^4 Zellen einer Monozyten- (THP-1), CD4+-T-Zell-Lymphozyten- (HUT78) sowie NK-Zelllinie (YT-Zellen) mittels FACS analysiert. Untersucht wurde das Vorhandensein der Rezeptoren CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 und CCR1, um in Zukunft für Versuche mit anderen Chemokinen wie IL-8, SDF-1 oder CCL5 eine Übersicht über das Rezeptorprofil zu haben. Für diese Arbeit stand wie erwähnt CXCR3 im Vordergrund. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

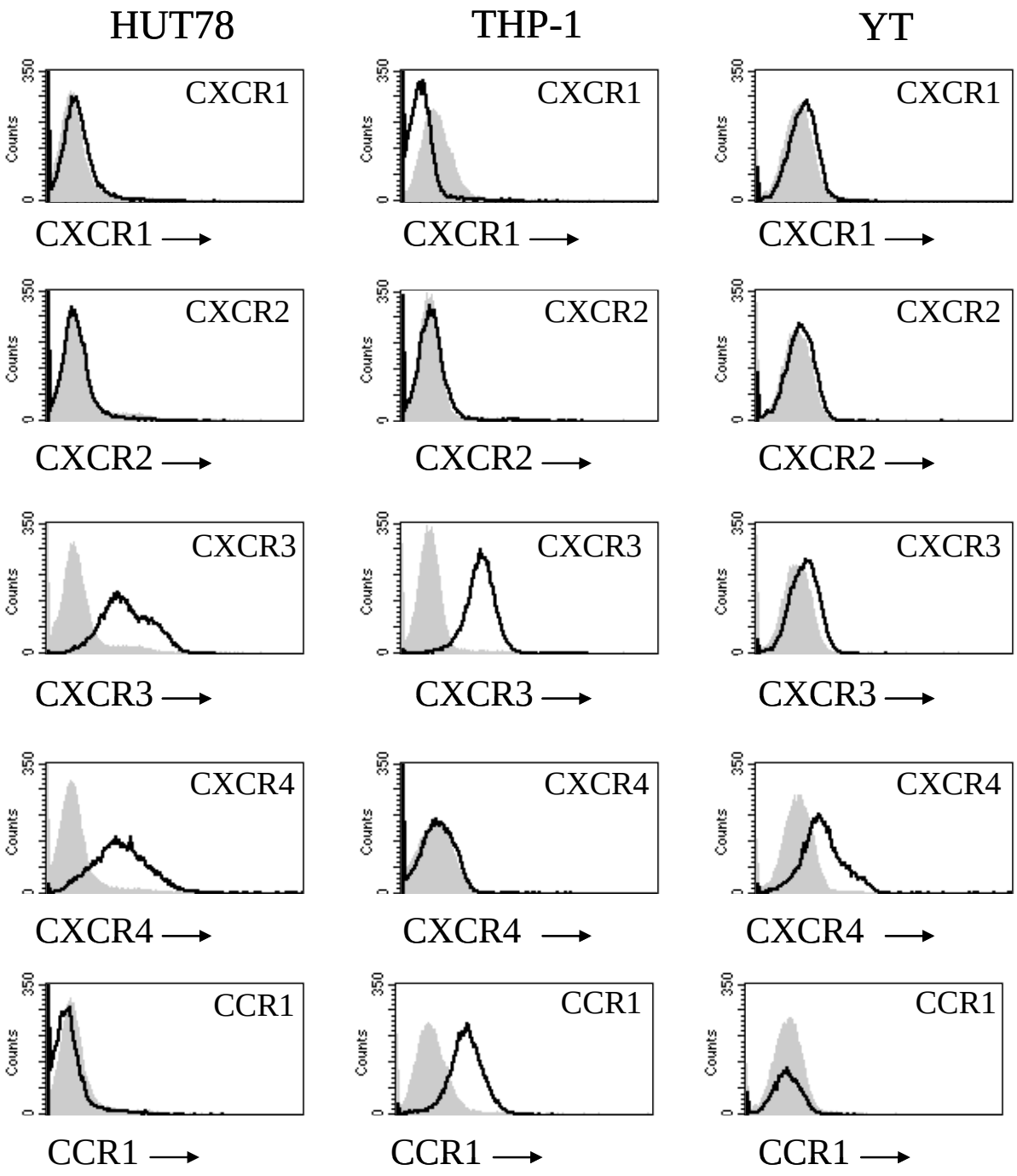


Abb.37: Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche von HUT78- (T-Zell-Lymphozytenzelllinie), THP-1 (Monozyten) sowie YT-Zellen (NK-Zellen). Die Expression der Chemokinrezeptoren an der Zelloberfläche wurde mittels FACS analysiert. HDBEC-Zellen wurden mit primären Antikörpern gegen CXCR1-4 sowie CCR1 und CCR5 bzw. der jeweilig entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt. Zur Detektion wurde ein PE-konjugierter sekundärer Antikörper verwendet. 5 x 10^4 Zellen wurden mittels FACS analysiert. Die vom Programm *CellQuest* erstellten Diagramme aus Isotypkontrollfärbung (grau hinterlegt) und Antikörper-Färbung (schwarze Linie) wurden übereinander gelegt Der für CXCL10 relevante Rezeptor CXCR3 findet sich in besonders deutlicher Ausprägung auf der Oberfläche der Lymphozyten-Zelllinie HUT78.

In Hinblick auf die verwandten CXCL10-Konstrukte lässt sich eine Oberflächenexpression von CXCR3 für jede untersuchte Zelllinie darstellen, besonders ausgeprägt für die

Monozyten-Linie THP-1 sowie die T-Zell-Linie HUT78, während für die Natürliche Killer-Zelllinie YT ein nur geringer Rezeptorenbesatz dargestellt werden kann.

YT-Zellen müssten jedoch den Rezeptor eindeutig exprimieren und sind in der Literatur als CXCR3-positiv beschrieben worden, weshalb diese neben der HUT78-T-Zelllinie für die geplanten Adhäsionsversuche ausgewählt wurden.

TRANSIENTE TRANSFEKTION MIKROVASKULÄRER ENDOTHELZELLEN

Wahrscheinlich aufgrund der geringen Proteinmenge sowie der mangelnden Reinheit des isolierten mucin CXCL10-GPI-Konstrukts verliefen die anschließenden *in vitro* Versuche (Migrations-, Proliferations-, Zelladhäsionsassay) wenig erfolgreich. Um jedoch die Richtigkeit des Konzeptes zu bestätigen, entschied man sich frühzeitig, parallel zu den Anstrengungen der Proteinisolierung unter Verwendung eines neuartigen Protokolls (siehe Doktorarbeit von S. Böcker sowie unten) den Zelladhäsionsversuch mit - mit den jeweiligen Konstrukten (CXCL10-GPI und mucin CXCL10-GPI) transient transfizierten - mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) durchzuführen. Vor Beginn der Transfektionsbemühungen sollten zunächst beide Chemokinkonstrukte aus dem pEF-dhfr-Vektor in einen unter einem CMV-Promoter stehenden, hocheffizienten pIRES2-eGFP-Vektor subkloniert werden.

SUBKLONIERUNG VON (MUCIN) CXCL10-GPI

Zur transienten Tranfektion von mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) mit den beiden Konstrukten wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem für die Transfektion der CHO-dhfr$^{(-/-)}$-Zellen verwendeten pEF-dhfr-Vektor ausgeschnitten und in den pIRES2-EGFP-Vektor ligiert. Vor der Transfektion wurde für beide Konstrukte durch eine DNA-Sequenzierung sichergestellt, dass keine Mutationen stattgefunden hatten.

Folgende Abbildung stellt den Klonierungsgang noch einmal dar:

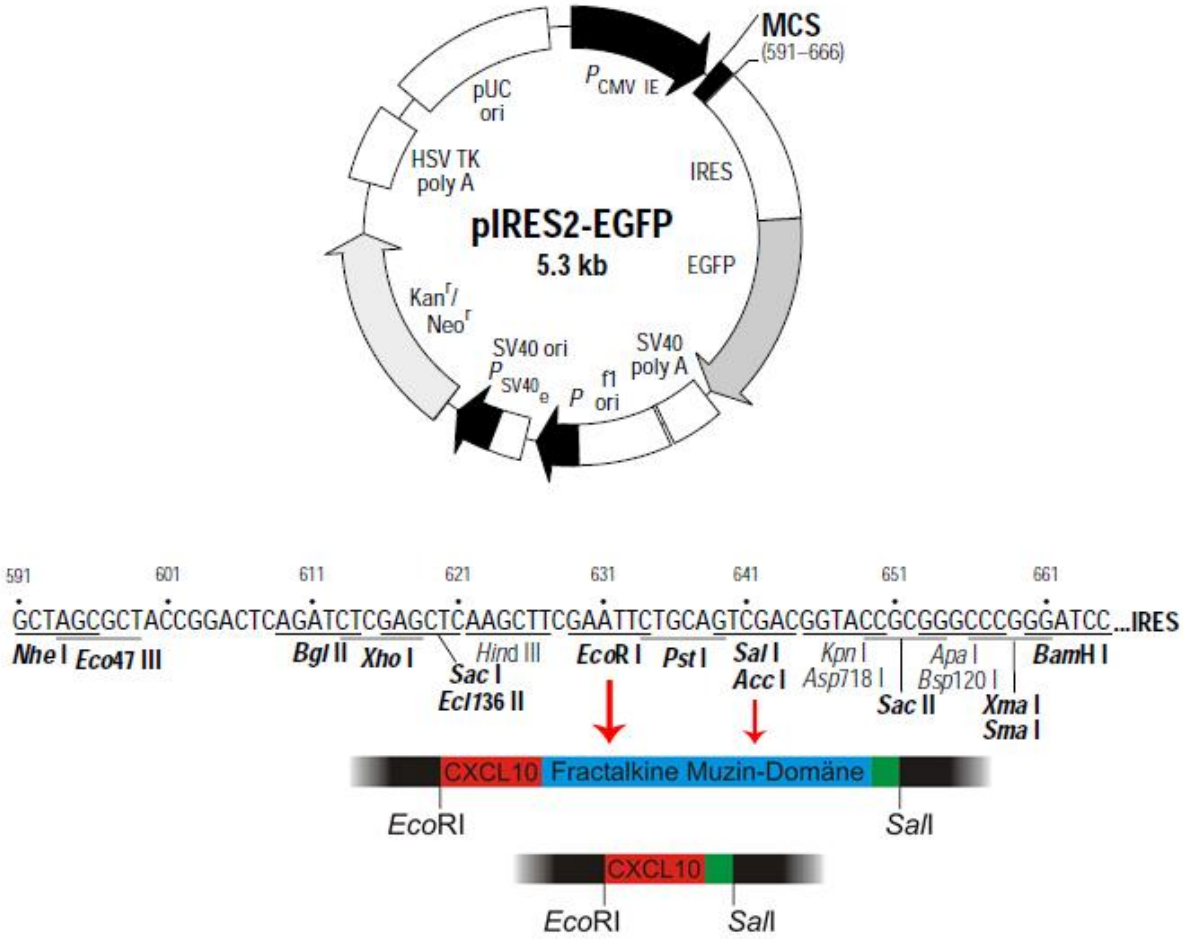


Abb.38: Subklonierung von (mucin) CXCL10-GPI. Oben dargestellt ist der für die Subklonierung verwendete Vektor pIRES2-EGFP, der die interne Ribosomenbindestelle (*internal ribosome binding site* [IRES]) zwischen der „*multiple cloning site*“ (MCS), in welche das jeweilig interessierende Gen hineinkloniert werden kann, und dem Gen für das verbesserte grün fluoreszierende Protein (eGFP, *enhanced green fluorescent protein*) enthält. Aufgrund dieser internen Ribosombindungsstelle können sowohl das eingefügte Gen als auch eGFP als Kontrolle separat von einer mRNA translatiert werden.
Unten findet sich eine Darstellung der MCS mit den Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Nach Öffnung des Vektors mit *Eco*RI und *Sal*I konnten die zuvor aufgereinigten Chemokinkonstrukte in den Vektor ligiert werden.

A) MAGNETOFECTION

Um die biologische Wirksamkeit der klonierten Proteine genauer untersuchen zu können, sollte ein Leukozyten-Adhäsions-Versuch (*flow adhesion assay*) angeschlossen werden. Bei diesem werden Leukozyten über einen Endothelrasen geleitet und mittels Mikroskopie mögliche Interaktionen von Leukozyt und Endothel beobachtet. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Inkorporation exogen zugeführten CXCL10 entschied man sich zugunsten einer transienten Tansfektion in humane mikrovaskuläre Zellen. Zunächst wurde der methodisch einfache und für die Zellen schonende Ansatz mittels Magnetofection angewandt. Die Transfektionsmethode richtete sich, wie oben beschrieben, nach dem Protokoll der Firma Promocell. Um optimale Transfektionsbedingungen gewährleisten zu

können, wurde in einer Vorversuchsreihe ein *renilla*-Luciferase enthaltendes Plasmid in wechselnder DNA-Menge (von 1 µg bis 9 µg) in HMEC-Zellen transfiziert und nach 24h nach vorhergehender Lyse im Luminometer mittels Messung der Luciferase-Aktivität analysiert. Als Negativkontrolle diente hier pIRES-eGFP-CXCL10-GPI. Pro DNA-Menge wurden 3 x 10^5 Zellen ausgewertet:

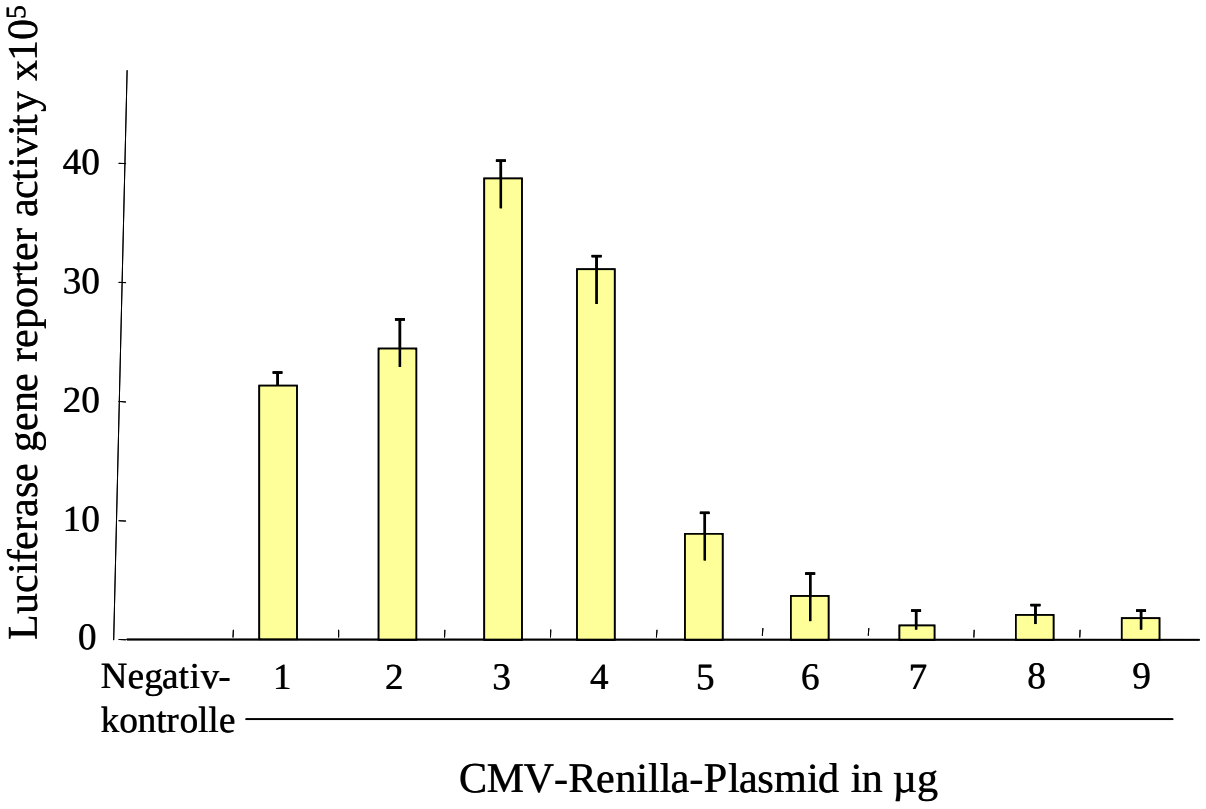


Abb. 39: Bestimmung der Luciferase-Aktivität als Maß der Transfektionseffizienz mittels Magnetofection. HMEC-Zellen wurden transient mit 1 bis 9 µg DNA eines CMV-*renilla*-Plasmids transient transfiziert. 24h nach Transfektion erfolgte nach vorhergehender Zelllyse die Bestimmung der Luciferaseaktivität im Luminometer. 3 x 10^5 Zellen wurden analysiert. Auf der Ordinate ist die Lumineszenz als Ausdruck der Luciferase- Aktivität, gemessen in relativen Lichteinheiten (*relative light units* [RLU]), auf der Abszisse die jeweils eingesetzte DNA-Menge. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Balken geben die Standardabweichung an.

Um die relativen Werte der Lumineszenz miteinander vergleichen zu können, wurde für jede eingesetzte DNA-Menge die gleiche Anzahl Zellen analysiert. Für Werte von 3µg DNA pro 3 x 10^5 Zellen zeigt sich die höchste Lumineszenz und somit auch größte Transfektionsrate, eine weitere Erhöhung der eingesetzten DNA zeigt keine Verbesserung der Ergebnisse, im Gegenteil ist hier ein deutlicher Abfall der Luciferase-Aktivität zu erkennen, so dass von einer geringeren Anzahl transfizierter Endothelzellen ausgegangen werden kann.

Für die folgenden Transfektionen mit pIRES-eGFP-(mucin)-CXCL10-GPI wurden folglich 3 µg DNA pro 300.000 HMEC-Zellen eingesetzt und der Erfolg 24 h nach Transfektion durch

FACS-Analyse von 3 x 10^4 Zellen sowie zur visuellen Korrelation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

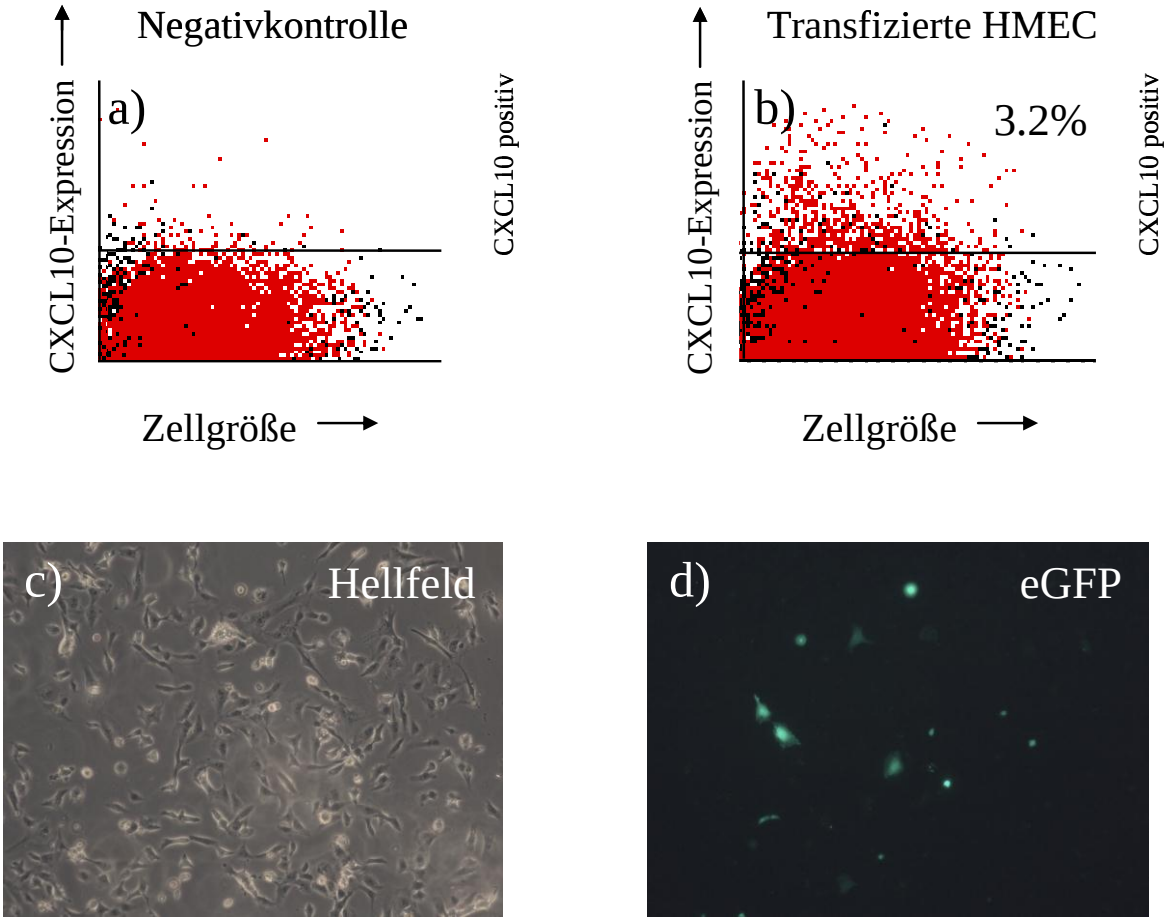


Abb.40: Transiente Transfektion von HMEC mit pIRES2-eGFP-(mucin)-CXCL10-GPI mittels Magnetofection. Auswertung der Effizienz durch FACS-Analyse (oben) sowie visueller Korrelation in der Fluoreszenzmikroskopie (unten).
a) und **b)** In Vorversuchen mit CMV-*renilla*-Plasmid wurde bei einer eingesetzten DNA-Menge von 3 µg die höchste Luciferase-Aktivität bestimmt (oben), so dass die DNA-Menge auch anschließend für die transiente Transfektion mit pIRES-eGFP-(mucin)-CXCL10-GPI benutzt wurde. Die transfizierten Zellen wurden 24h nach Magnetofection gegen CXCL10 gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Primärantikörper wurden mit PE-konjugiertem *anti-goat-IgG* nachgewiesen, 3 x 10^4 Zellen wurden untersucht. Auf der Ordinate befindet sich die Fluoreszenz als Ausdruck der Antikörperbindung und somit CXCL10-Oberflächenexpression auf den HMEC-Zellen, auf der Abszisse ist der „*forward scatter*“ als Maß der Zellgröße eingetragen. Links die Analyse für die Isotypkontrollfärbung, rechts für CXCL10.

c) und **d)** Zur visuellen Korrelation wurde eine geringere Anzahl von transfizierten Zellen zeitgleich mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre eGFP-Expression kontrolliert. Dargestellt sind ein repräsentativer Bildausschnitt im Hellfeld **c**) sowie in der Fluoreszenz **d**) (Vergrößerung 175fach).

Wie man an dem exemplarisch gezeigten Diagramm für mucin CXCL10-GPI erkennen kann, zeigen nur 3,2 % der untersuchten Zellen eine Expression von CXCL10 auf ihrer Zellmembran, d.h. es kann nur von dieser geringen Anzahl erfolgreich transfizierter Zellen ausgegangen werden. Dies wurde auch visuell in der Fluoreszenzmikroskopie untermauert. Für den Adhäsionsversuch sollten jedoch mindestens 10-20% des Endothels das

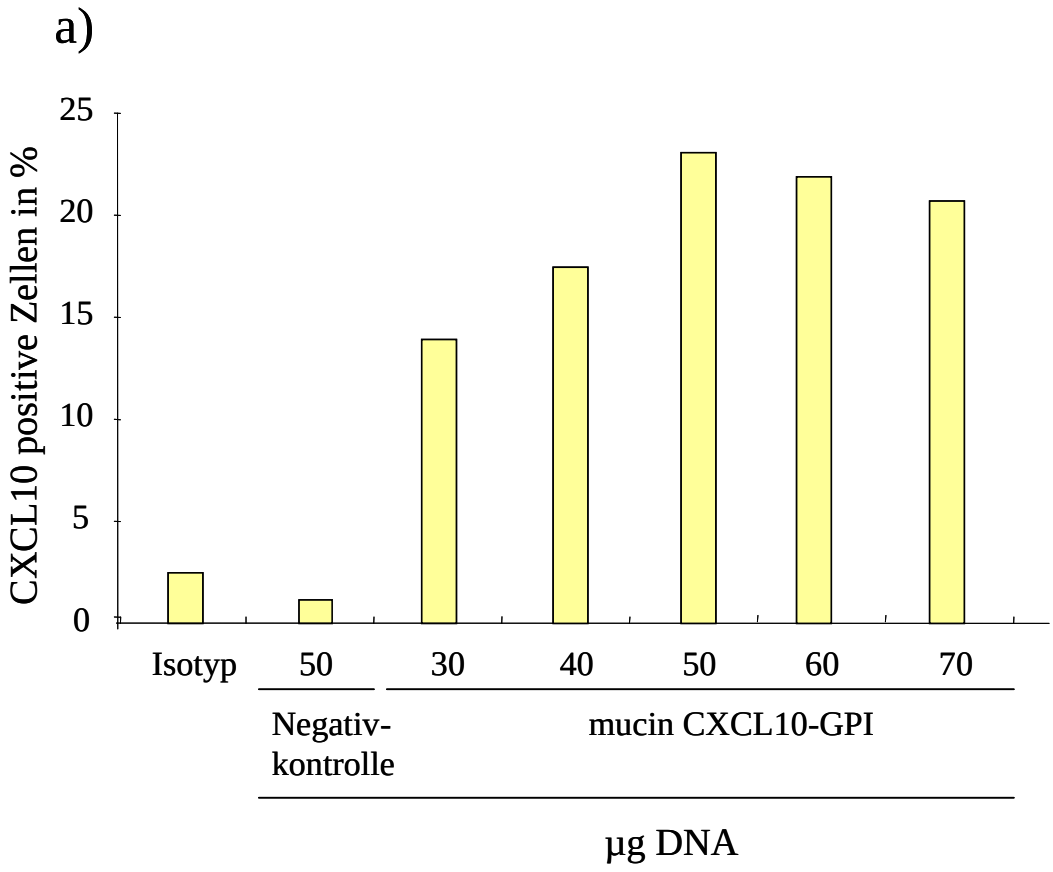
Chemokinkonstrukt auf ihrer Oberfläche exprimieren, um mögliche Effekte auf die Endothel-Leukozyten-Interaktion sinnvoll untersuchen zu können.

Der Versuch wurde zu Zwecken der Reproduzierbarkeit wiederholt. Es konnte jeweils eine nur ungenügende Transfektionseffizienz von unter 5% erreicht werden, so dass im Anschluss dieser Ansatz verlassen und die Methode der Elektroporation angewandt wurde.

B) ELEKTROPORATION

Die Transfektionsmethode richtete sich, wie oben beschrieben, nach dem von Hernandez *et al*. publizierten Vorgehen. Zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen wurden systematisch die Variabeln Puffer und eingesetzte DNA-Menge untersucht. Vorversuche hatten ein optimales Überleben der transfizierten Zellen bei einer FBS-Konzentration im Versuchspuffer von 30% ergeben. Zur Bestimmung der optimalen DNA-Menge wurden je 2 x 10^6 HMEC-Zellen mit 30 µg – 70 µg pIRES2-EGFP-(mucin)-CXCL10-GPI-Plasmid transfiziert. Zu einem Zeitpunkt von 24h nach Transfektion erfolgte die Analyse der detektierbaren CXCL10-Oberflächenexpression mittels FACS.

3 x 10^4 HMEC-Zellen wurden pro Ansatz untersucht, zusätzlich erfolge eine visuelle Korrelation der Ergebnisse mit der Fluoreszenzmikroskopie.



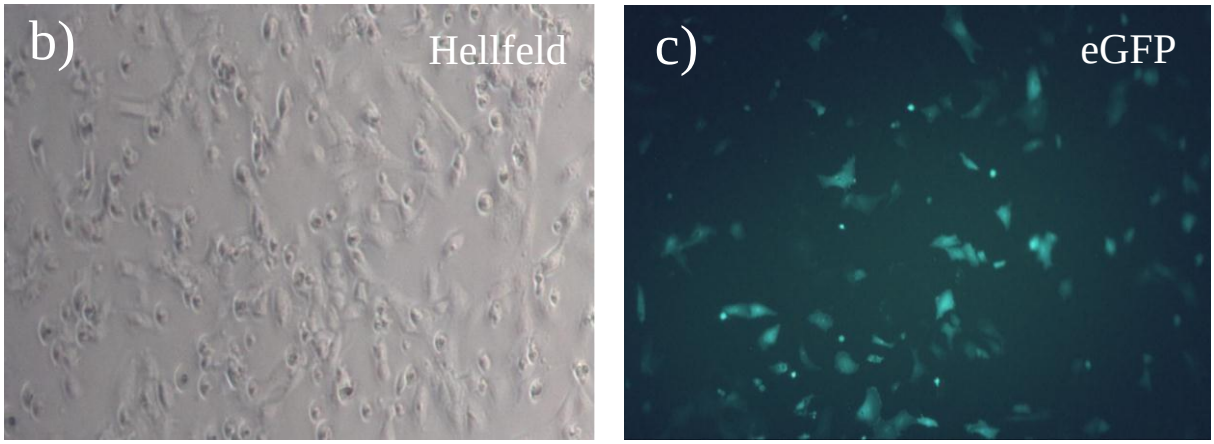


Abb.41: Transiente Transfektion von HMEC mit pIRES2-eGFP-mucin-CXCL10-GPI mittels Elektroporation. Die Auswertung der Effizienz erfolgte mittels FACS-Analyse. Pro Ansatz wurden jeweils 2 x 10^6 Zellen verwendet. Diese wurden in insgesamt 400 µl Versuchsmedium (RPMI 1640 mit 30% FCS) und der jeweiligen DNA-Menge inkubiert und elektroporiert. Als Negativkontrolle wurde ein ebenfalls GPI-verankertes Protein (pEF-OVA-GPI) transient transfiziert.
a) Das Histogramm zeigt den Anteil transfizierter Zellen in Prozent.
b) und **c)** Visuelle Bestätigung der Daten mittels Hellfeld- **b)** sowie Fluoreszenzmikroskopie **c)** (175fache Vergrößerung)**.**

Ab einer eingesetzten DNA-Menge von 50 µg können reproduzierbar Transfektionsraten von über 20% erzielt werden. Dies ist auch visuell in der Fluoreszenzmikroskopie zu bestätigen. Eine weitere Steigerung der eingesetzten Menge bedeutet keine verbesserte Effizienz, so dass für alle folgenden Transfektionen 50 µg Plasmid pro Versuchsansatz verwandt wurden. Dies bedeutet eine Änderung des von Hernandez *et al*. publizierten Protokolls, das eine DNA-Menge von 30 µg für 2 x 10^6 Zellen postuliert.

FLOW ADHESION ASSAY

Nachdem sich für den Einsatz von 50 µg DNA für die Transfektion von 2 x 10^6 Endothelzellen die besten Ergebnisse gezeigt hatten, wurde diese Menge eingesetzt, um die *in vivo* Funktionalität der CXCL10-Konstrukte unter physiologischen Flussbedingungen zu überprüfen. Der Versuchsablauf ist oben beschrieben, als Negativkontrolle wurde pIRES2-EGFP-GPI transfiziert, während des Versuches wurde eine Scherkraft von 0,4 dyn/cm^2 erzeugt. Als Erinnerung sollen hier noch einmal die Auswertungskriterien genannt werden. Als feste Adhäsion wurde eine Leukozyt-Endothel-Interaktion von 30 sec, als rollende Adhäsion eine signifikante Änderung des zunächst schnellen Flusses der HUT78-Zellen im Sinne einer Verlangsamung und Abweichung aus dem zentral laminaren Strom in Nähe des Endothels definiert. Die Summe der detektierten Interaktionen wird als Ereignisse pro mm^2 Endothel ausgedrückt.

Folgende Ergebnisse konnten generiert werden:

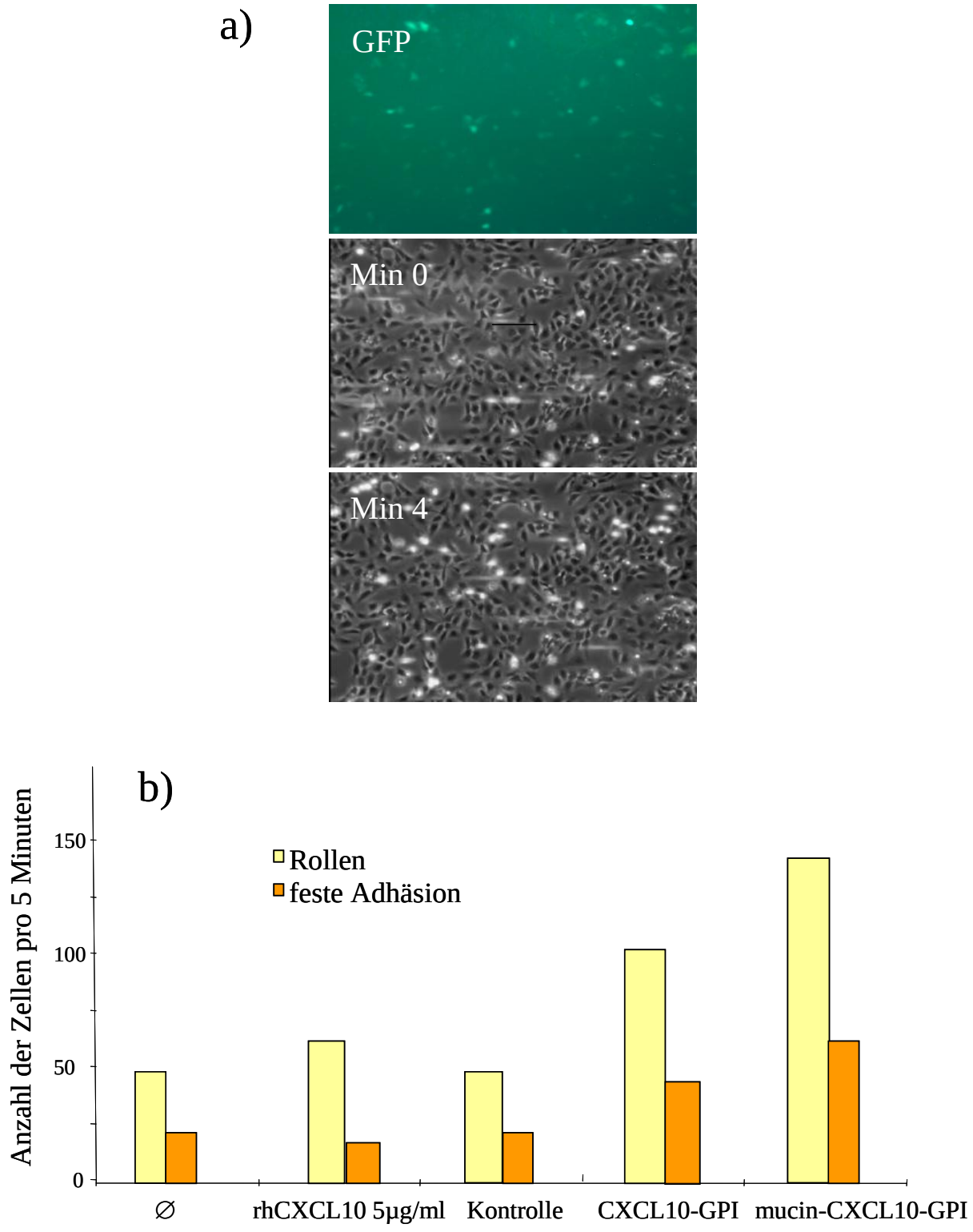


Abb.42: „*Flow Adhesion Assay*“ mit HUT78 und mit pIRES-eGFP-CXCL10-GPI und pIRES-eGFP-mucin-CXCL10-GPI transient transfizierten mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC)
a) Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung gegen eGFP, darunter mit der Kamera aufgenommene Bilder zum visuellen Eindruck stattgehabter Leukozyten-Endothelkontakte
b) Quantifizierung der Leukozyten-Endothel-Kontakte in Form von Rolling und fester Adhäsion für reinen Puffer (**∅**), rekombinantes CXCL10 (rhCXCL10), eine GPI-verankerte Kontrolle sowie CXL10-GPI und mucin CXCL10-GPI.

Wie prinzipiell erwartet zeigten sich (wenn auch sehr geringe) Effekte auf das „*rolling*“ sowie die feste Adhäsion von HUT78-Zellen an das Endothel für das CXCL10-Konstrukt, das zusätzlich zur Membranverankerung die Mucindomäne trägt. Für CXCL10-GPI war im Vergleich zur GPI-verankerten Negativkontrolle (GFP-GPI), reinem Puffer sowie rekombinanten CXCL10 ein schwächerer Effekt nachweisbar. Dies ist damit zu erklären, dass die Versuche mit einem unstimulierten Endothel durchgeführt wurden und somit keine Hochregulation der endothelialen Zelladhäsionsmoleküle erfolgt war. Für CXCL10-GPI ist ein endothelialer Oberflächenbesatz mit ICAM und Selektinen Bedingung für eine effektive Leukozytenadhäsion. Das mit der Mucin-Domäne des Chemokins Fractalkine versehene Konstrukt mucin CXCL10-GPI hingegen ist, wie erwartet, davon unabhängig. Für den beobachteten geringen Effekt auf die Leukozytenadhäsion ist in diesen Versuchen nicht eine vorherige Aktivierung der Endothelzellen und die damit verbundene Hochregulierung von ICAM und Selektinen notwendig.

Durch die Entwicklung eines modifizierten Isolierungsprotokolls für (mucin) CXCL10-GPI wurde in der Zwischenzeit eine Aufreinigung der Chemokine in ausreichender Quali- sowie Quantität erreicht, so dass der Adhäsionsversuch mit exogen zugeführtem Protein wiederholt werden konnte.

Rationale der neuen Methode ist hierbei die Verwendung eines Protein-Affinitäts-*tags* (c-myc), mit dem die Chemokinkonstrukte fusioniert wurden. Die Aufreinigung erfolgt in einem Affinitätschromatographieschritt über die Bindung des Proteins an einen Antikörper und die anschließende Elution durch Veränderung des pH-Wertes zum Sauren. (Für genaue Informationen zur Methode siehe die Dissertation von Sophia Böcker.)

Für die sich nun anschließenden Adhäsionsversuche wurden als Endothelzellen humane dermale Endothelzellen (HDBEC) sowie als Leukozyten Natürliche Killerzellen (YT-Zellen) verwandt. Der Versuchsaufbau entsprach dem oben skizzierten, zusätzlich erfolgte bei der Hälfte der Versuchsansätze eine Stimulation des Endothels mit 1 ng/ml IL-1ß. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse:

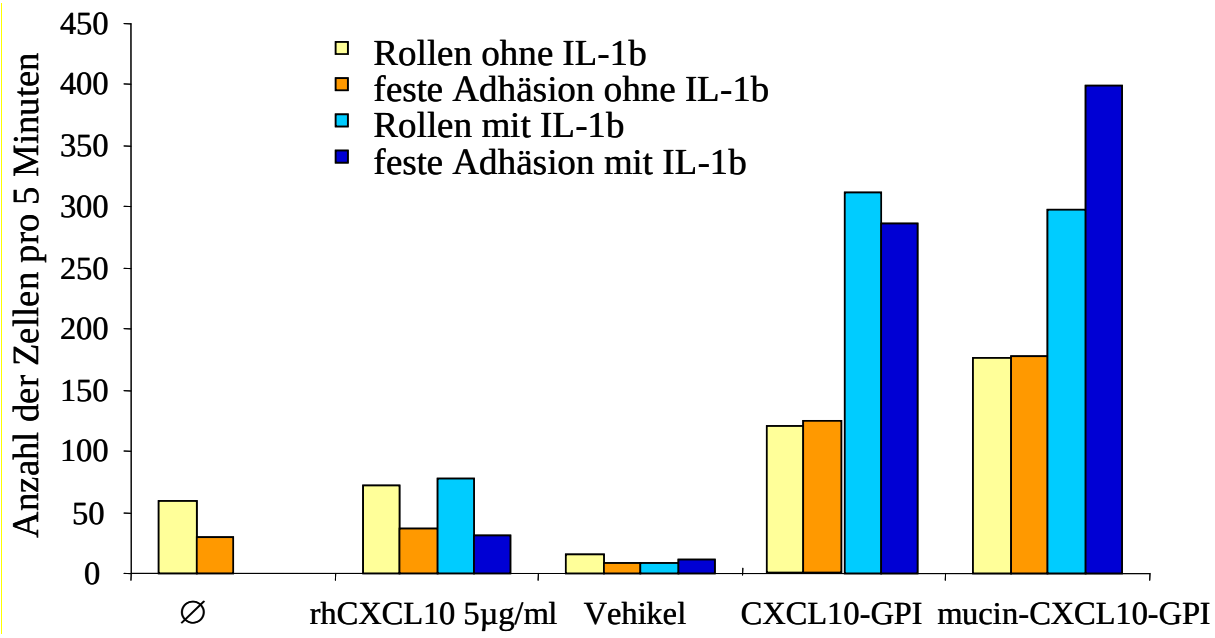


Abb.43: ***Flow adhesion assay*** **mit YT-Zellen (Natürliche Killerzellen) sowie dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDBEC)** Quantifizierung der Leukozyten-Endothel-Kontakte in Form von Rolling und fester Adhäsion für die verschiedenen Versuchsbedingungen. Während für sämtliche Kontrollbedingungen keine nennenswerte Zell-Zell-Interaktion beobachtet werden kann, zeigen beide Chemokinkonstrukte sowohl mit unstimuliertem als auch mit IL-1ß vorbehandeltem Endothel deutliche Effekte. Die hohe Anzahl des Rollens unter Einsatz von CXCL10-GPI (trotz nicht exogen stimulierten Endothels) lässt eine gewisse endogene Aktivierung der Zellen vermuten.

Während bei Einsatz von Medium bzw. Vehikel (Puffer) keine nennenswerte Anzahl von rollender bzw. fester Adhäsion zu beobachten ist, kann nach Gabe von 5ng/ml rekombinanten CXCL10 ein zumindest geringfügiger Effekt beobachtet werden. Die Versuchsergebnisse zeigen eine deutlich höhere Anzahl an Interaktionen für beide Chemokinkonstrukte.

Erwartungsgemäß sind hierbei sowohl für das Rollen als auch die feste Adhäsion der Natürlichen Killerzellen an das Endothel nach Stimulation der HDBEC-Zellen mit Il-1ß und konsekutiver Produktion von Selektinen und Integrinen wie z.B. E-Selectin und ICAM1 die meisten Ereignisse zu konstatieren. Konkordant mit den theoretischen Überlegungen ist hierbei ein Effekt für beide Proteine zu beobachten. Während CXCL10-GPI mittels der Chemokindomäne nur eine bereits bestehende rollende Adhäsion in eine feste überführen kann, ist mucin CXCL10-GPI dank der zusätzlich eingefügten mucin-ähnlichen Domäne Fractalkines in der Lage, unabhängig von der endothelialen Stimulation selbst eine rollende Interaktion hervorzurufen. Dies zeigt sich in der höheren Anzahl der festen Adhäsionen im Vergleich zu CXCL10-GPI.

Die Versuchsbedingungen mit stimuliertem Endothel können durchaus mit physiologischen verglichen werden, da im peritumoralen Gewebe häufig ein inflammatorisches Milieu und somit Ausschüttung von IL-1ß vorliegt.

Idee des Projektes war es jedoch, eine von Begleitumständen wie vorheriger Endothelaktivierung weitgehend unabhängige Möglichkeit der Rekrutierung von Leukozyten zu demonstrieren. Wie bei den Versuchen mit dem transient transfizierten Endothel lassen sich auch ohne vorherige Stimulation Zell-Zell-Interaktionen für hier beide Proteinkonstrukte beobachten. Dabei lassen sich für mucin CXCL10-GPI im Vergleich zu CXCL10-GPI mehr Ereignisse detektieren. Dies untermauert die Funktionalität der vom Chemokin Fractalkine übernommenen Mucin-Domäne, die ein Ligand für auf Leukozyten exprimiertes L-Selectin ist. Auch CXCL10-GPI zeigt unter den nicht-stimulierten Versuchsbedingungen eine im Vergleich zu den Kontrollbedingungen erstaunlich hohe Zahl an rollenden Adhäsionen, zumal das Protein allein nicht in der Lage sein sollte, eine rollende Adhäsion zu vermitteln. Diese Beobachtung kann durch eine geringgradige Stimulierung des Endothels unter in vitro Bedingungen erklärt werden, so dass die Endothelzellen einen gewissen Satz an oberflächlichen Adhäsionsmolekülen exprimieren.

PROLIFERATION

Zusätzlich zu der chemotaktischen Wirkung sind für CXCL10 in der Literatur angiostatische Effekte beschrieben worden (Strieter *et al*., 1995; Angiolillo *et al*., 1995), was auch in einem humanen Tumormodell bestätigt werden konnte (Arenberg *et al*., 1996).

Sollte dies auch für die Konstrukte (mucin) CXCL10-GPI gelten, wäre eine zweifache Wirkung der Proteine denkbar: Nach peritumoraler Injektion würde a) die körpereigene Immunabwehr stimuliert und b) das Tumorwachstum sowie die Metastasierungspotenz durch Hemmung der Ausbildung neuer Blutgefäße vermindert. Um den Effekt der Chemokinkonstrukte darzustellen, können mikrovaskuläre Endothelzellen (als Vorläufer neuer Blutgefäße) mit dem jeweiligen Protein versehen werden. Nach bestimmten Zeitintervallen kann dann die Zellzahl pro Versuchsansatz als Marker für die angiogenetischen Prozesse bestimmt und verglichen werden.

Auch die Proliferationsversuche wurden mit dem nach neuem Protokoll isolierten CXCL10 durchgeführt. Um den konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss von CXCL10-GPI und mucin CXCL10-GPI auf die Proliferation von Endothelzellen und somit die Angiogenese zu bestimmen, wurden HDBEC-Zellen wie oben beschrieben für 24h, 48h oder 72h mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Proteinkonstrukte inkubiert und anschließend analysiert. Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse graphisch:

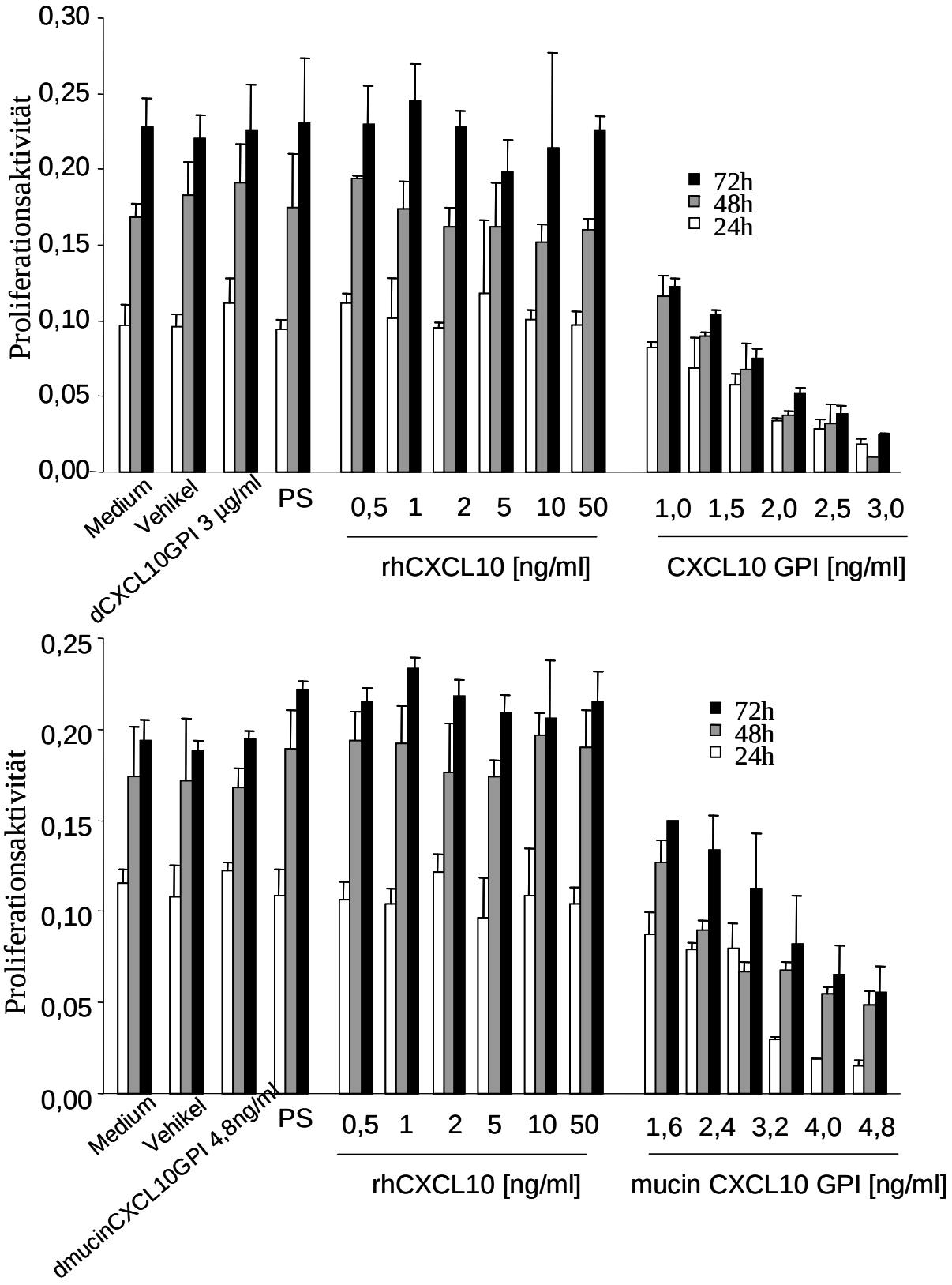


Abb.44: CXCL10-GPI und mucin CXCL10-GPI hemmen die Proliferationsaktivität von HDBEC-Zellen
$5x10^4$ HDBEC-Zellen wurden am Vortag des Versuches in 100 µl Medium in Flachbodenplatten ausgesät. Nach 12h wurden die Zellen in zusatzfreiem Medium kultiviert. Nach weiteren 12h wurde das jeweilige Proliferationsmedium (1% Supplement MV) hergestellt, mit den jeweiligen Zusätzen auf jeweils 200 µl angesetzt und gegen das zusatzfreie Medium ausgetauscht. Nach einer Inkubationszeit von 24h, 48h bzw. 72h wurden je 50 µl einer 1 mg/ml MTT-Lösung hinzugegeben. Es wurde 3 h bei 37 °C inkubiert, daran anschließend erfolgte für 5 min eine Zentrifugation bei 2000g. Nun wurde der Überstand verworfen, die

entstandenen Formazankristalle mit je 100 µl Isopropanol und 0,4 N HCL gelöst und die Lichtabsorption bei 550 nm am ELISA-Lesegerät gemessen.

Während nach Inkubation der mikrovaskulären dermalen Endothelzellen mit denaturiertem Protein sowie rekombinanten CXCL10 in verschiedenen Konzentrationen kein eindeutiger Effekt auf die Proliferation in Vergleich zu einem Versuchsansatz mit reinem Medium zu konstatieren ist, lässt sich sowohl für CXCL10-GPI als auch für mucin CXCL10-GPI ein deutlicher Effekt darstellen. Auch wenn die Proliferation nicht vollständig gestoppt werden kann, wird durch beide Proteine zeit- und konzentrationsabhängig die Zellteilung in ihrer Kinetik deutlich verlangsamt.

Für das rekombinante Protein wurden im Vergleich zu den Konstrukten viel höhere Mengen an Protein eingesetzt. Dies ist damit zu erklären, dass nicht-modifiziertes CXCL10 als lösliches Protein in nicht genügender Menge an den Endothelzellen zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu werden die beiden rekombinanten Konstrukte mit Hilfe ihres GPI-Membranankers effizient in die Zellmembran inkorporiert. Durch die so fixierte Wirkung in lokal höherer Konzentration scheint (mucin-) CXCL10-GPI noch deutlich wirksamer als die rekombinante Kontrolle zu sein. Der angiostatische Effekt könnte durch eine bessere Interaktion des Chemokins mit seinem Rezeptor CXCR3 als auch durch nicht-Rezeptor-vermittelte Wirkungen wie die direkte Bindung von Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF-2 oder Inhibition derer Rezeptorinteraktionen geschehen.

Dies ist v.a. für den Einsatz in einem *in vivo* Experiment von Bedeutung, da hier –mehr noch als unter *in vitro* Versuchsbedingungen- Verdünnungseffekte eine Rolle spielen können. Durch die Verankerung könnten schon geringe Mengen eines exogen zugeführten Adjuvans einen angiostatischen Effekt hervorrufen.

V DISKUSSION

Nach den kardiovaskulären Erkrankungen stellen Malignome in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Zur Charakterisierung der entarteten Zellen können hierbei vor allem zwei Eigenschaften angeführt werden: Zum Einen die Zellvermehrung, die unabhängig von externen Signalen abläuft und zum Anderen die Fähigkeit, in Gewebe einzudringen und somit auch in weit entfernten Arealen des Körpers Kolonien zu bilden (Metastasierung). Beide Eigenschaften werden durch genetische Alterationen vermittelt. Die meisten Mutationen entstehen durch intrinsische Fehler der DNA-Replikation, wobei eine einzelne genetische Läsion meistens nicht für die Entstehung einer malignen Neoplasie ausreicht; der maligne Phänotyp wird nur erreicht, wenn mehrere, in der Regel fünf bis zehn, Mutationen zur Fehlsteuerung einiger Genprodukte führen. Die häufigsten genetischen Änderungen sind hierbei die Aktivierung von Protoonko- oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Als direkte Folge werden Signalprozesse ihrer Regulierung von außen entzogen und somit eine ungehemmte Abfolge des Zellteilungszyklus, eine Loskopplung der Kontaktinhibition und eine veränderte Expression von membrangebundenen als auch sezernierten Proteinen erreicht. Neoplastische Zellen zeichnen sich z.B. durch eine gesteigerte Angioneogenese, aber auch durch ein verändertes Membranproteinprofil aus.

Die Anstrengungen in der Tumortherapie stützten sich bisher vornehmlich auf die großen Säulen Chirurgie, Chemotherapie, Strahlentherapie und Immuntherapie, wobei unter kurativen Gesichtspunkten eindeutig der Chirurgie der größte Stellenwert eingeräumt werden muss. Das vorrangige Ziel der Malignombehandlung besteht in der Beseitigung der entarteten Zellen, wobei hier die chirurgische, möglichst vollständige Resektion im Vordergrund steht.

Die Chemotherapie kommt vor allem bei der Behandlung bereits generalisierter Leiden mit entsprechend palliativer Zielsetzung zur Anwendung. Als Teil multimodaler Bemühungen wird sie aber auch neoadjuvant, d.h. vor der Operation mit dem Ziel einer Tumormassenverkleinerung, oder adjuvant, d.h. nach einer Operation mit dem Ziel einer vollständigen Vernichtung operativ nicht fassbarer Mikrometastasen eingesetzt. Je nach eingesetztem Chemotherapeutikum ist die Behandlung mit mehr oder weniger Toxizität und Nebenwirkungen versehen und zudem auch psychisch mit erheblichen Belastungen für die Betroffenen verbunden.

Die Strahlentherapie ist nur für eine kleine Anzahl verschiedener Entitäten sinnvoll, wobei die jeweilige Krankheit in einem lokalisierten Stadium erfasst werden muss. Bereits große lokale Strahlenfelder wie z.B. das früher in der Therapie des Mb. Hodgkin oft benutzte Mantelfeld, das eine Bestrahlung des fast gesamten Thorax vorsah, sind mit einer beträchtlichen Nebenwirkungsrate verbunden. Neben den akuten Schäden sei auch die wesentlich erhöhte Inzidenz von leukämischen Folgeproblemen erwähnt.

Vor diesem Hintergrund erscheint die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien als sinnvolles Unterfangen. Mit den steigenden Kenntnissen über Akteure, Vorgänge und gegenseitige Interaktionen der verschiedenen Komponenten des menschlichen Immunsystems versucht man auch im Rahmen der Tumortherapie neue Wege zu betreten. Verschiedene Ansätze werden hierbei verfolgt.

Allogene und autologe Stammzelltransfusionen werden genauso wie mögliche Tumorvakzine oder die Stimulation Antigen-präsentierender dendritischer Zellen experimentell auf ihre Effizienz untersucht. Allen diesen Konzepten ist der Gedanke der überragenden Bedeutung der T-Zell-vermittelten Immunität gemeinsam: Das Wissen um die Vorgänge, die bei der allogenen Knochenmarkstransplantation, dem damit verbundenen adoptiven T-Zell-Transfer und einer sich anschließenden Fremderkennung des Malignoms durch Spenderleukocyten beobachtet werden können, gilt hierbei als Beweis der Fähigkeit von T-Zellen, Tumorzellen abzutöten. Hauptproblem der praktischen Verwendbarkeit aller theoretischen Überlegungen liegt momentan jedoch in einer oftmals mangelnden Akkumulation der Effektorzellen im entarteten Gewebe (Okada, 2006).

Daher erscheinen Chemokine aufgrund ihrer chemotaktischen Eigenschaften als mögliche Lösung dieses Problems. Eine lokale Modulierung der Mediatorkonzentrationen könnte zu der erhofften gezielten Rekrutierung einer ausreichenden Anzahl von Effektor-T-Zellen mit konsekutivem Anti-Tumor-Effekt führen. Als bisherige Strategien wurden eine direkte Applikation von Chemokinen sowie ein retroviral vermittelter Transfer der entsprechenden Gene in die maligne entarteten Zellen verfolgt (Homey *et al*., 2002; Okada, 2005). Der mangelnde Erfolg beider Methoden beruht zum Einen auf der schnellen systemischen Verdünnung bei direkter Injektion sowie der bereits beschriebenen verhinderten Extravasation aufgrund einer zu frühzeitig einsetzenden Aktivierung der Abwehrzellen. Zum Anderen ist ein Einschleusen von Genen über Vektoren mit einer großen Ungewissheit bezüglich Effizienz und anschließender Expression verbunden (Liu *et al.*, 2007).

Der hier verfolgte Ansatz, in Zellmembranen verankerbare Proteine zu benutzen, umgeht diese Problematik: Da Proteine benutzt werden, ist man von möglichen Expressions- und Translationsniveaus unabhängig; die Membranverankerung verhindert eine frühzeitige Aktivierung der Leukozyten, erzeugt den gewünschten lokalen chemotaktisch wirksamen Gradienten und ist somit nah an der physiologisch beobachtbaren Wirklichkeit.

„Interferon-inducible protein of 10 kDa“ (IP-10 / CXCL10) entfaltet seine pro-inflammatorische Wirkung aufgrund chemotaktischer Effekte auf Natürliche Killer– und TH1- Zellen. Eine anti-tumoröse Wirksamkeit ist bereits vor geraumer Zeit beschrieben worden. Es konnte durch Rekrutierung aktivierter Monozyten, T-Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen das Tumorwachstum von murinen mammären Adenocarcinomen sowie Plasmozytomen signifikant eindämmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein aus Membrananker und Chemokin (CXCL10-GPI) in Zellen des chinesischen Hamsters stabil exprimiert werden kann. Dies wurde durch Fusion der cDNA von CXCL10 mit der Signalsequenz zur Verankerung des Zelladhäsionsproteins LFA-3 erreicht. In einem zweiten Schritt wurde dieses Modell um die Mucin-ähnliche Domäne von CX3CL1 erweitert, was eine leukocytäre Diapedese ohne Abhängigkeit von Adhäsionsmolekülen ermöglichen sollte.

All diese erhofften Effekte setzten zunächst eine quantitativ als auch qualitativ ausreichende Isolierung aus den Chinesischen Hamsterzellen und die biologische Funktionalität der Konstrukte voraus. Die genaue Kenntnis der in allen folgenden Versuchen benutzten Proteinkonzentrationen ist für die wissenschaftliche Interpretation und Verwertbarkeit aller erhaltenen Ergebnisse essentiell. Daher ist der Arbeitsschritt der Entwicklung eines standardisierten, sicher reproduzierbaren Aufreinigungsprotokolls von größter Bedeutung.

Als Problem erwies sich die geringe Ausbeute des Proteins unter Einsatz der konventionellen proteinchemischen Methoden. Dabei erschien bereits die initiale Solubilisierung des menbranverankerten Proteins mit Triton X-100 als nicht optimal. Nur eine bereits initial geringe Menge der Proteine konnte mittels des Detergens extrahiert werden. Diese Beobachtung stimmt gut mit früheren Studien überein, die zeigten, dass GPI-verankerte Proteine in Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Mikrodomänen der Zellmembran akkumulieren und sogenannte Lipidflöße (*lipid rafts*) bilden. Durch diesen Prozess werden die Proteine unempfindlich gegenüber einer Solubilisierung mit Triton X-100 bei 4°C (Schroeder *et al*., 1998). Diese Eigenschaft wurde früher sogar zur Identifikation von GPI-verankerten Proteinen verwendet (Hooper und Turner, 1988).

Die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford konnte keine Konzentration des Proteinkonstruktes ermitteln. Dies gelang für CXCL10-GPI mit Hilfe der Methoden eines spezifischen „*enzyme linked immunosorbent assay*“ (ELISA), die Konzentrationen befanden sich jedoch stets im unbefriedigenden Nanogrammbereich, wobei hier noch einmal auf die bereits initial geringe Proteinmenge hingewiesen werden soll. Für mucin CXCL10-GPI konnte auch mittels ELISA keine Proteinkonzentration des Isolats bestimmt werden.

Eine Analyse der jeweiligen Chromatographieschritte ergab, dass als größtes Problem neben den Verlusten aufgrund unzureichender Bindung des Proteins v.a. in der Polymerisierung von CXCL10 liegt, was die Elution von der Säule erschwert und vor allem während des letzten Schrittes der Gelfiltration beobachtet wird. Diese Polymerisierung ist ein unter physiologischen Bedingungen stattfindender Vorgang, der für die Funktion der Chemokine *in vivo* von Bedeutung ist (Proudfoot *et al*., 2003); im Rahmen der Aufreinigung schien es jedoch zur Ausbildung großer Oligo- bis Polymere zu kommen, was eine höhere Ausbeute verhinderte.

Neben dem quantitativen Problem muss die nicht perfekte Qualität des Isolats auch nach allen Reinigungsschritten kritisch erwähnt werden. Die Ergebnisse der Silberfärbung zeigten stets

eine gewisse Anzahl verunreinigender Nebenproteine, die ihrerseits eine Interaktion mit CXCL10 eingehen und so einen gewissen Effekt auf die Versuchsergebnisse ausüben können. Während CXCL10-GPI nach den Chromatographieschritten relativ rein isoliert werden konnte, zeigte sich für mucin CXCL10-GPI aufgrund der Polymerisations-Problematik bei Einsatz der Gelfiltration und dem damit verbundenen Verwerfen dieser Isolierungsmethode konsequenterweise ein größerer Anteil verunreinigender Nebenproteine.

Unter dem primär verfolgten Aufreinigungsschema scheiterten sämtliche nachfolgenden funktionellen Versuche an der zu geringen eingesetzten Proteinmenge. Trotzdem sollte die Fähigkeit besonders von mucin CXCL10-GPI, Leukozytensubpopulationen aus dem Blutstrom zu rekrutieren, nachgewiesen werden.

Zu diesem Zweck wurden mikrovaskuläre Endothelzellen transient mit CXCL10-GPI bzw. mucin CXCL10-GPI transfiziert. Dabei zeigte die - für die Zellen als schonender erachtete - Magnetofection auch nach Modifizierung der Versuchsparameter keine ausreichende Effizienz, so dass dieser Ansatz verlassen und die Methode der Elektroporation versucht wurde. Hier konnten nach geringfügiger Modifizierung des von Hernandez *et al*. 2004 beschriebenen Protokolls unter Einsatz von 50 µg anstatt der in der Publikation empfohlenen 30 µg Plasmid-DNA konstant ausreichende Transfektionsraten von >20% erreicht werden. Somit konnte der bislang - unter Verwendung der Isolate - nicht auswertbare Zelladhäsionsversuch wiederholt werden.

Die Experimente konnten zeigen, dass bei Scherkräften von 0,4 dyn/cm^2 sowohl rollende als auch feste Adhäsionsereignisse detektiert und quantifiziert werden können. Im Vergleich zur Negativkontrolle war für (mucin) CXCL10-GPI zumindest einen Trend zu einer gesteigerten Anzahl sowohl von „*rolling*“ als auch von „*firm adhesion*“ erkennbar.

Dies entspricht dem erwarteten Einfluss von (mucin) CXCL10-GPI auf die Lymphozytenpopulation und beweist die Richtigkeit des Konzeptes der durch die Chemokinkonstrukte beeinflussbaren Migration und Diapedese menschlicher Abwehrzellensubsets. Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, dass der Versuch auch ohne vorherige Stimulierung des Endothels mittels IL-1ß durchgeführt werden konnte. Der Trend zur vermehrten Adhäsion der HUT78-Lymphozyten an das Endothel ist somit nicht einer Hochregulierung von Zelladhäsionsmolekülen, sondern vielmehr dem Chemokinkonstrukt zuzuschreiben.

Als Nachteil des Versuchsaufbaus muss allerdings die schwierige Auswertung der Ergebnisse genannt werden: Die Quantifizierung der Ereignisse unterliegt methodenbedingt (rein visuelle Auswertung) einer nicht unerheblichen Subjektivität des jeweiligen Beobachters. Des Weiteren können bei vielen simultan ablaufenden Vorgängen einige der Aufmerksamkeit des Auswertenden entgehen.

Anstrengungen zur besseren Standardisierung des Auswertungsvorganges und der damit verbundenen besseren Reproduzierbarkeit des jeweiligen Ergebnisses umfassten eine Aufteilung des Sichtfeldes in mehrere kleine Felder und eine anschließende getrennte Auswertung der einzelnen Bereiche. Dadurch konnte die Varianz in einem gewissen Rahmen reduziert werden. Dennoch könnte nur durch eine völlig automatisierte Zählung der Ereignisse für eine unabhängige und zuverlässig jederzeit reproduzierbare Interpretation der einzelnen Versuche gesorgt werden.

Während dieser Versuche gelang es, parallel eine neue Methode der CXCL10-Aufreinigung zu entwickeln. Für Einzelheiten wird auf die Dissertation von Frau Sophia Böcker verwiesen. Im Folgenden soll hier nur das zugrunde liegende Konzept der Aufreinigung der Proteinkonstrukte über eine einstufige Affinitätschromatographie nach vorheriger Fusion mit dem kleinen „c-myc*"-tag* erwähnt werden. C-myc interagiert dabei mit dem Immunglobulin 9E10, die Reinigung erfolgt über eine Elution mit pH-Verschiebung ins Saure.

Als weiterer Schritt auf dem Weg zum *in vivo* Experiment konnte nun der Adhäsionsversuch unter Einsatz der aufgereinigten Proteine, diesmal unter Verwendung einer NK (Natürlichen Killer) –Zelllinie und dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDBEC) durchgeführt werden. Dieser bestätigte die prinzipielle Unversehrtheit des GPI-Ankers sowie die Möglichkeit der Zellrekrutierung v.a. durch mucin CXCL10-GPI, wobei auch hier ohne vorherige Stimulation des Endothels mit Interleukinen ein guter Effekt konstatiert werden konnte. Auch wenn für CXCL10-GPI ohne vorherige Zugabe von IL-1ß Rollen sowie feste Adhäsionen beobachtet werden konnten und somit auf eine gewisse endogene Stimulation des Endothels während des Versuches geschlossen werden muss, spricht die höhere Anzahl der detektierten Ereignisse, vor allem des Rollens, für die Richtigkeit des Konzeptes. Aufgrund der vom Chemokin Fractalkine übernommenen Mucin-artigen Domäne besitzt mucin CXCL10-GPI intrinsisch die Möglichkeit der Vermittlung des von weiteren Faktoren unabhängigen Rollens mit konsekutiver fester Adhäsion von Leukozyten an das Endothel.

Zusätzlich wurde die angiostatische Potenz beider Proteinkonstrukte untersucht.

CXCL10 hemmt die Ausbildung neuer Blutgefäße, ein wachstumshemmender Effekt auf humane Tumorzellen (Arenberg *et al*., 1996) ist ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben worden. Die Frage war nun, ob die Proteinkonstrukte diese Fähigkeit ebenfalls besitzen oder im Zuge der Modifikation verloren haben.

Im Versuch mit mikrovaskulären dermalen Zellen zeigte sich nicht nur eine verbliebene Funktion von (mucin) CXCL10-GPI, im Vergleich zu der rekombinanten Kontrolle waren - aufgrund der lokalen Verankerung- deutlich geringere Mengen eingesetzten Proteins sogar stärker wirksam.

Somit bestätigt sich ein zweiter vielversprechender Mechanismus von CXCL10 für die anti-tumorale Therapie:

Neben Anlockung der „passenden“ (gegen den Tumor gerichteten) Leukozytenuntergruppen wird zusätzlich eine Verminderung der Wachstumspotenz des Tumors durch den angiostatischen Effekt erzielt. Dies kann wiederum eine geringere Metastasierungspotenz des Primarius zur Folge haben, da weniger neue Gefäße ausgebildet werden und somit die hämatogene Aussaat erschwert wird.

Noch einmal zusammengefasst waren die konventionellen Methoden der Proteinisolierung (Heparin-Affinitäts-, Kationenaustauscher- sowie Gelfiltrationschromatographie) nicht in der Lage, die beiden CXCL10-Konstrukte in ausreichender Quanti- sowie Qualität zu generieren. Die Richtigkeit der Grundthese der angiostatischen (Proliferationsversuch) sowie migration- sowie Diapedese-fördernden Wirkung (Leukozytenadhäsionsversuch mit einem transient die Chemokinkonstrukte exprimierenden Endothel) von CXCL10 konnte jedoch belegt werden, so dass weitere Modifikationen des Isolierungsprotokolls entwickelt wurden. Kurz vor dem Ende dieser Arbeit gelang unter Verwendung einer neuen Methode (c-myc) der Durchbruch, dies wird in der Dissertation von Frau Sophia Böcker ausführlich behandelt. In Zukunft kann somit der bislang nicht realisierte Mausversuch (Modell des kutanen T-Zell-Lymphoms) zur Überprüfung der Funktionalität des Konstruktes *in vivo* geplant werden. Sollte dieser positive Ereignisse zeigen, wäre auch der kombinierte Ansatz von Chemokinen mit anderen adjuvanten Methoden denkbar.

So ist eine Kombination des Chemokin-Konstrukts mit Inhibitoren der Matrixproteasen, die in der Invasion sowie Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen, möglich.

VI AUSBLICK

Der Adhäsionsversuch erbrachte wichtige Hinweise zur Richtigkeit des Prinzips der Funktionalität der Konstrukte. Mithilfe des mucin CXCL10-GPI-Produkts kann auch an unstimuliertem Endothel eine Leukozytenadhäsion erreicht werden.

Im Proliferationsversuch konnte die bekannte angiostatische Funktion von CXCL10 auch für beide Konstrukte in einer größeren Potenz, verglichen mit rekombinantem Protein, gezeigt werden.

Die Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung sind bereits in der Einleitung dargelegt worden, sollen hier aber noch einmal unterstrichen werden:

Durch die Anwendung des modifizierten Chemokins direkt in der peritumoralen Region kann die Voraussetzung für die Rekrutierung eines spezifischen Leukozytensubsets geschaffen und so die Immunantwort lokal stimuliert werden.

Durch die Verwendung der von dem Chemokin „Fractalkine“ (CX3CL1) gewonnenen Mucin–ähnlichen Domäne ist ein Umgehen der ersten beiden Schritte des ansonsten schematisch ablaufenden Diapedese-Prozesses der Leukozyten möglich. Die Vorgänge des initialen Rollens (*rolling*) und der anschließenden Triggerung der Leukozyt–Endothel–Interaktion (*triggering*) werden übersprungen und somit die Extravasation der Effektorzellen vereinfacht. Zusätzlich kann durch den GPI-Membrananker das Konzept des „*cell paintings*“ verwirklicht werden.

Des Weiteren sind beide Konstrukte angiostatisch wirksam und können sowohl das Wachstum des Primärtumors als auch seine Metastasierungspotenz vermindern.

Zusätzlich kann die Wirksamkeit der Therapie durch die Kombination mit Metallmatrixproteasen-Inhibitoren noch weiter gesteigert werden. Die Bedeutung von (Metallo-)Matrixproteasen (MMP) für Tumorinvasion und –metastasierung ist seit geraumer Zeit bekannt (Bode und Maskos, 2003). Die Aktivität der MMP kann jedoch durch entsprechende Inhibitoren, die *„tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*“ (TIMP) gebremst werden (Bode *et al*., 1999: Brew *et al*., 2000).

Ferner scheint diese Proteingruppe auch die Prozesse der Empfindlichkeit gegenüber apoptotisch wirksamen Signalen beeinflussen zu können (Krammer *et al*., 2000; Li-Weber und Krammer, 2003). Tumore, die sonst gegenüber der zytotoxischen Aktivität CD8- oder Natürlicher Killerzellen resistent waren, können durch die Behandlung mit TIMP wieder resensitiviert werden (Strand *et al*., 2004). Auch hier eröffnet die Verknüpfung mit einem Membrananker (GPI) neue Möglichkeiten (Djafarzadeh *et al*., 2004).

Besonders interessant erscheint so die Anlockung der „passenden“ Abwehrzellen durch CXCL10-basierte Proteinkonstrukte und die nachfolgend erhöhte Wirksamkeit der zytotoxischen T-lymphozytären Immunabwehr durch TIMP-vermittelte Wirkungen.

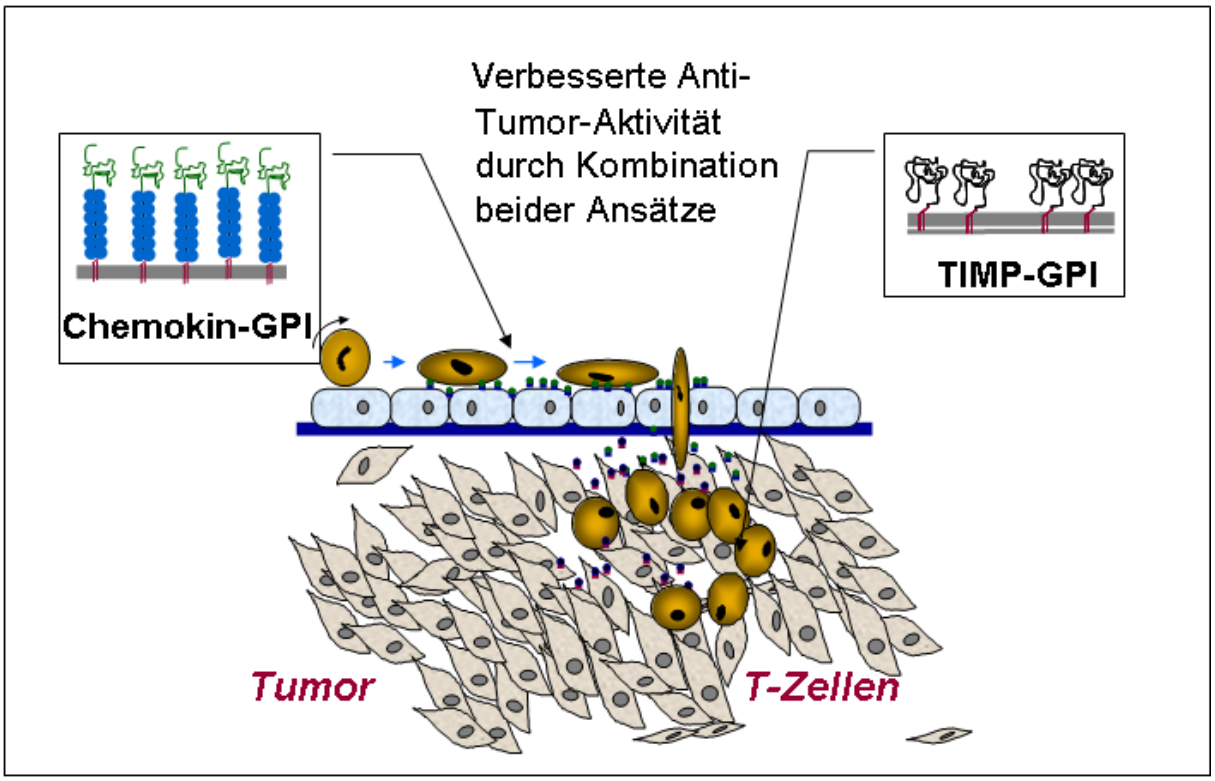


Abb.45: Möglichkeiten der Interaktion und gegenseitigen Verstärkung der anti-tumor-Aktivität zweier Ansätze
a) Zunächst steht die Optimierung der Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen durch mithilfe von GPI-Ankern in der Zellmembran inkorporierten Chemokinen im Vordergrund: Das Gefäßendothel wird durch Zugabe des Mediators in einen Status gebracht, der mit dem einer Entzündung vergleichbar ist. **b)** Der Effekt des GPI-Chemokins soll zu einer Verstärkung der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen führen. **c)** Durch Zugabe GPI-verankerten TIMP wird die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber den T-Zellen gesteigert. (Mit freundlicher Genehmigung von Peter J. Nelson)

Allerdings sind vor Testung dieses kombinierten Ansatzes noch weitere Versuche notwendig. Nächstes Ziel sollte primär ein positives *in vivo* Experiment der aufgereinigten Proteine sein.

VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy-DNA , DNA-Kopie von mRNA-Molekülen
CHO-Zellen	chinese hamster ovary Zellen, Ovarzellen aus chinesischem Hamster
CMC	critical micelle concentration, kritische Mizellenkonzentration
ConA	Concavalin A
DAF	decay accelerating factor
DEAE	Diethylaminoethyl
dFBS	dialysiertes fötales Rinderserum
dhfr	Dihydrofolatreduktase
D-MEM	Dullbecco´s Modified eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enyzme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Reticulum
FACS	fluorescence activated cell scanning
FBS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	fast protein liquid chromatography
G418	Geneticidinsulfat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
HBSS	Hank´s balanced salt solution
HDBEC	Human dermal blood endothelial cells
HMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HT-Supplement	Mischung aus Hypoxanthin und Thymidin
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1

IgG	Immunglobulin G
IRES	internal ribosome entry site, interne Ribosomenbindestelle
LB	lysogeny broth, Lysogenie-Medium
LFA	lymphocyte function associated antigen
mAU	milli absorption units
MEM alpha	Minimum essential Medium alpha
MHCI	major histocompatibility complex I, Haupthistokompatibilitätskomplex I
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PVDF	Polyvinylindenfluorid
rhCXCL10	rekombinantes humanes CXCL10
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkriptase
SDS	sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Selectin	Kombination aus "selected" und "Lectin", Zelladhäsionsmolekül
SOC	super optimal broth with glucose
TARC	thymus- and activation-regulated chemokine
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TGFβ	transforming growth factor β, transformierender Wachstumsfaktor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinasen
Triton X-100-H	Triton X-100, hydrogenisiert
TSK	Toyo Soda Kogiyu
U	Units (Einheiten)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Abbassi, O. et al. (1993) Neutrophil adhesion to endothelial cells. *Blood Cells* 19 (2), 245-259

Angiolillo, A.L. et al. (1995) Human interferon-inducible protein-10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J. Exp. Med*. 1, 155-162

Arenberg, D.A. et al. (1997) The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer *J. Leukoc. Biol.* 62, 554-562

Baggiolini, M. (2001) Chemokines in pathology and medicine. *Journal of Internal Medicine* 250, 91-104

Bazan, J. F. et al. (1997) A new class of membrane-bound chemokines with a CX3C motif. *Nature* 385, 640-644

Birkeland, S.A. et al. (1995) Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986 *Int. J. Cancer* 60, 183-189

Bode, W. et al. (1999) Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann. NY Acad. Sci*. 878, 1-11

Bode, W. et Maskos, K. (2003) Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol. Chem*. 6, 863-872

Brew, K. et al. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1477 (1-2), 267-283

Brown, D. (2002) Structure and function of membrane rafts. *International Journal of Medical Microbiology* 291 (6-7), 433-437

Buell, J.F. et al. (2005) Malignancy after transplantation. *Transplantation* 80 (2 Suppl), S254-264

Burnet, F.M. (1957) Cancer- a biological approach *Brit. Med. J*. 1 841-847

Burnet, F.M. (1964) Immunological factors in the process of carcinogenesis *Br. Med. Bull* 20, 154-158

Burnet, F.M. (1970) The concept of immunological surveillance *Prog. Exp. Tumor Res*. 13, 1-27

Burstein, N.A. et Law, L.W. (1971**)** Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice. *Nature*. Jun 18;231(5303):450-2

Charo, I.F. et Ransohoff, R.M. (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in Inflammation. *New Engl. J. Med*. 6, 610-221

Cimino, A.M. et al. (2004) Cancer vaccine development: protein transfer of membrane-anchored cytokines and immunostimulatory molecules. *Immunologic research* 29 (1-3), 231-240

Cinamon, G. et al. (2001) Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nature Immunology* 2 (6), 515-522

Cines, D.B. et al. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 10, 3527-3561

Clark, W.H. Jr. et al. (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst*. 81, 1893-1904

Clemente, C.G. et al. (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma *Cancer* 77, 1303-1310

Detmers, P.A. et al. (1990) Neutrophil-Activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *Journal of experimental medicine* 171, 1155-1162

Dighe, A.S. et al. (1994) Enhanced in vivo growth and resistence to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN receptors. *Immunity* I, 447-456

Djafarzadeh, R. et al. (2004) Exogenously added GPI-anchored tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) displays enhanced and novel biological activities. *Biol. Chem.* 7, 655-663

Dunn, G.P. et al. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol*. 11, 991-998

Ferguson, M.A. et al. (1985) Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphospatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma bruzei variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 27, 14547-14555

Ferguson, M.A. et Williams, A.F. (1988) Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem*. 57, 285-320

Furuichi, K. et al. (2008) IFN-Inducible Protein 10 (CXCL10) Regulates Tubular Cell Proliferation in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Nephron Exp Nephrol* 2008;109:e29-e38

Gattass, C.R. et al. (1994) Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes. *J. Exp. Med*. 179(4), 1373-1378

Giese, N.A. et al. (2002) Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immuncompetent mice. *Cancer Gene Ther*. 5, 432-442

Glomset, J.A. et al. (1990) Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem. Sci.* 4, 139-142

Goger, B. et al. (2002) Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for onomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites. *Biochemistry* 41 (5), 164-1646

Grant, G.A. et Miller, J.F. (1965) Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57BL mice. *Nature* 205, 1124-1125

Hanahan, D. et Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70

Hantke, K. et Braun, V. (1973) Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 2, 284-296

Haut Donahue, T.L. et al. (2003) Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport. *Journal of Biomechanics* 36, 1363-1371

Heller, E.A. et al. (2006) Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation* 113(19):2301-12

Hernandez, J.L. et al. (2004) A highly effective electroporation method for the transfection of endothelial cells. *Angiogenesis* 3, 235-241

Hochmuth, R. et al. (1973) Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophysical Journal* 13, 747-762

Homey, B. et al. (2002) Chemokines: Agents für the immunotherapy of cancer? *Nature Reviews Immunology* 2 (3), 175-184

Hooper, N.M. und Turner, A.J. (1988) Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane - differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *The Biochemical Journal* 250, 865-869

House, S.D. et Lipowsky, H.H. (1988) In vivo determination of the force of leukocyte-endothelium adhesion in the mesenteric microvasculature of the cat. *Circulation Research* 63 (3), 658-668

Hunte, C. et al. (2003) Membrane protein purification and crystallization: A practical guide. *Academic Press Inc*. London, 2nd edition.

Ikezawa, H. (2002) Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- anchored proteins. *Biol. Pharm. Bull*. 4, 409-417

Imai, T. et al. (1997) Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91, 521-530

Kaplan, D.H. et al. (1998) Demonstration of an interferon-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 7556- 7561

Kaplan, H.S. (1971) Role of immunologic disturbance in human oncogenesis: some facts and fancies. *Br. J. Cancer* 25, 620-634

Kaplanski, G. et al. (1994) Interleukin-l induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* 84 (12), 4242-4248

Kelner, G.S. et al. (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399

Kerfoot, S.M. et al. (2003) Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *Europan Journal of Immunology* 33, 729-739

Klein, G. (1966) Tumor antigens. *Annu Rev. Microbiol.* 20, 223-252

Klein, G. (1973) Immunological surveillance against neoplasia. *Harvey Lect*. 71-102

Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 6805, 789-795

Kunkel, E.J. et Butcher, E.C. (2002) Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 1, 1-4

Kunkel, E.J. et Butcher, E.C. (2002) Homeostatic chemokines and the targeting of regional immunity. *Adv. Exp. Med. Biol*. 51, 65-72

Kunkel, S.L. et Godessart, N. (2002) Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun Rev.* 1, 313-320

Kuschert, G.S. et al. (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38, 12959-12968

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lasagni, L. et al. (2003) An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial growth induced by IP-10, Mig and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* 11, 1537-1549

Lawrence, M.B. et Springer, T.A. (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65, 859-873

Lawrence, M. et al. (1987) Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* 70 (5), 1284-1290

Leen, A.M. et al. (2007) Improving T cell therapy for cancer. *Annual Review of Immunology* 25, 243-265

Legler, D.F. et al. (2005) Differential insertion of GPI-anchored GFPs into lipid rafts of live cells. *FASEB Journal* 19 (1), 73-75

Li, J. et al. (2004) Synergistic anti-tumor effect of glykosylphosphatidylinositol-anchored IL-2 and IL-12. *The Journal of Gene Medicine* 6 (7), 777-785

Li, R. et al. (2003) Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. *Langenbecks Arch. Surg*. 6, 406-412

Li-Weber, M. et Krammer, P.H. (2003) Function and regulation of the CD95 (APO-1/FAS) ligand in the immune system. *Semin. Immunol.* 3, 145-157

Liu, H. et al. (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260, 712–717

Liu, M.T. et al. (2001) Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis, *J. Immunol*, 167(7):4091-7

Liu, S. et al. (2007) Enhanced antitumor responses elicited by combinatorial protein transfer of chemotactic and costimulatory molecules. *Journal of Immunology* 178, 3301-3306

Loetscher, M. et al. (1996) Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 3, 963-969

Luan, J. et. al. (1997) Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol,, 62(5):588-97*

Luscinskas, F.W. et al. (1996) L-and P-selectins, but not CD49dd (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-α-activated vascular endothelium under flow in vitro. *Journal of Immunology* 156, 326-335

Luster, A.D. (1998) Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436-445

Luster, A.D. et Leder, P. (1993) IP-10, a –C-X-C-chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J. Exp Med*. 178, 1057-1065

Mackay, C.R. (2001) Chemokines: immunology´s high impact factors. *Nature Immunology* 2 (2), 95-101

Maniatis, T. et al. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Habor Laboratory Press*, Cold Spring Habor, New York

Mantovani, A. et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 12, 677-686

Medof, M.E. et al. (1996) Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins. *FASEB Journal* 10, 574-586

Middleton, J. et al. (2002) Leukocyte extravasation: chemokine tranport and presentation by the endothelium. *Blood* 100 (12), 3853-3860

Moser, B. et Loetscher, P. (2002) Lymphocyte traffic: control by chemokines. *Nat. Immunol.*, 2, 123-128

Moss, R.B. et al. (2004) Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12, 187-1896

Murphy, P.M. et al. (2000) International union of pharmacology. XXII nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol.Rev*. 52, 145-176

Nelson, P.J. et Krensky, A.M. (2001) Chemokines, chemokine receptors and allograft rejection. *Immunity* 14, 377-386

Okada, N. (2005) Cell delivery system: a novel strategy to improve the efficacy of cancer immunotherapy by manipulation of immune cell trafficking and biodistribution. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28 (9), 1543-1550

Old, L.J. et Boyse, E.A. (1964) Immunology of experimental tumors *Annu. Rev. Med*. 15, 167-186

Opdenakker, G. et Van Damme, J. 2004) The countercurrent principle of invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int. J. Dev. Biol.* 5-6, 519-527

Pan, H. et al. (1997) Apoptosis and cancer mechanisms. *Cancer Surv*. 29, 305-327

Patel, D.D. et al. (2001) Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clinical Immunology* 99 (1), 43-52

Penn, I. (1996) Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61, 274-278

Penn, I. (1999) Posttransplant malignancies. *Transplant Proc.* 31, 1260-1262

Perollet, C. et al. (1998) Platelet factor 4 modultes fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 91; 3289-99

Pham, S.M. et al. (1995) Solid tumor after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann. Thorac. Surg*. 60, 1623-1626

Power, C.A. et Wells, T.N. (1996) Cloning and characterization of human chemokine receptors. *Trends Pharmacol. Sci*. 6, 209-213

Premkumar, D.R.D. et al. (2001) Properties of exogenously added GPI-anchored proteins following their incorporation into cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 82, 234-245

Proudfoot, A.E. et al. (2001) The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J. Biol. Chem.* 276, 10620-10626

Proudfoot, A.E. 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

Robertson M.J. et Ritz, J. (1990) Biology and clinical relevance of natural killer cells. *Blood* 12, 2421-2438

Romagnani, P. et al. (2001) Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J. Clin. Invest.* 1, 53-62

Romagnani, P. et al. (2004) CXC chemokines: the regulatory link between imflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 25, 201-209

Rossi, D. et Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology* 18, 217-242

Russell, J.H. et Ley, T.J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol*. 20, 323-370

Sallusto, F. et al. (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 593-620

Salmivirta, M. et al. (1996) Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J.* 10, 1270-1279

Sasisekharan, R. et Venkataraman, G. (2000) Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 626-631

Schendel, D.J. et al. (1993) Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of Immunology* 151, 4209-4220

Schmidt, M.F. et al. (1979) Evidence for covalent attachment of fatty acids to Sindbis birus glycoproteins. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 4, 1687-1691

Schroeder, R.J. et al. (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (2), 1150-1157

Segerer, S. et al. (2000) Chemokines, chemokine receptors and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 152-176

Sevlever, D. et al. (1999) Glycosylphosphatidylinositol-anchor intermediates associate with Triton-insoluble membranes in subcellular compartments that include the endoplasmatic reticulum. *Journal of Biochemistry* 343, 627-635

Sheil, A.G.R. (2001) in *Kindney Transplantation* (ed. Morris, P.J.) 558-570

Shurin, M.R. et al. (1999) Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin. Immunpathol.* 2, 229-259

Slein, M.W. et Logan, G.R. (1965) Characterization of the Phospholipases of Bacillus cereus and Their Effects on Erythrocytes, Bone And Kidney Cells. *J. Bacteriol*. 1, 69-81

Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314

Strand, S. et al. (2004) Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumor cells. *Oncogene* 20, 3732-3736

Street S.E. et al. (2001) Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth and metastasis. *Blood*, 97, 192-197

Strieter, R.M. et. al. (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis *J Biol Chem*., 270(45):27348-57

Strieter, R.M. et al. (2004) CXC chemokines in angiogenesis in cancer. *Semin Cancer Biol*, 14, 195-200

Strieter, R.M. et al. (2005) CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 6,593-609

Stutman, O. et Good, R.A. (1971) Immune response and neoplasia *Adv Biol Skin*. 11, 357-85

Stutman, O. (1972) Immunologic studies on resistance to oncogenic agents in mice *Natl Cancer Inst Monogr*. 35, 107-15

Stutman, O. (1973) Lymphocyte sequestration: its possible role in tumor immunity *Transplant Proc*. 5(1), 969-73

Stutman, O. (1974) Cell-mediated immunity and aging. *Fed Proc*., 33, 2028-32

Stutman, O. (1975) Immundepression and malignancy *Adv. Cancer Res* 22, 261-422

Taub, D.D. et al. (1993) Recombinant human interferon-inducible protein-10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* 6, 1809-1814

Taub, D.D. (1996) Chemokine-leukocyt interactions. The voodoo that they do so well. *Cytokine Groth Factor Rev.* 7, 355-376

Taub, D.D. et al. (1996) Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice. *Blood*, 87, 1423-1431

Towbin, H. et al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76 (9), 4350-4354

Trainin, N. et al. (1967) Enhancement of lung adenoma formation by neonatal thymectomy in mice treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene or urethan *Int. J. Cancer* 2, 326-336

Tumova, S. et al. (2000) Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Intl J. Biochem. Cell Biol*. 32, 269-288

Turnbull, J. et al. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol*. 11, 75-82

Umehara H. et Imai, I. (2001) Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration in vascular injury. *Drug News Perspect*. 14, 460-464

Umehara, H. et al. (2004) Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 34-40

von Luettichau, I. et al. (1996) RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues. *Cytokine* 8, 89-98

Wahlin, B.E. (2007) CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 13 (2 Pt 1), 388-397

Wallace, M.E. et Smyth, M.J. (2005) The role of natural killer cells in tumor control-effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin. Immunopathol*. 1, 49-64.

Weber, K.S.C. et al. (1999) Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Europan Journal of Immunology* 29, 700-712

Wenzel, J. et al. (2007) Enhanced type I interferon signaling and recruitment of chemokine receptor CXCR3-expressing lymphocytes into the skin following treatment with the TLR7-agonist imiquimod. *J. Cutan. Pathol.* 4, 257-262

Worthylake, R.A. et Burridge, K. (2001) Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 569–577

Yang, J et Richmond, A. (2004) The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol. Ther*. 6, 846-855

IX CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Constantin Frederik Victor Lapa
Anschrift:	Franziskanerstr. 2a 81669 München
Telefon:	089/ 44 42 99 87
Geburtsdatum und -ort:	16.09.1982 in Münster/Westf.
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulische Ausbildung:

8/1988 – 6/1992:	Kardinal-von-Galen-Grundschule in Sendenhorst
8/1992 – 6/2001:	Bischöfl. Gymnasium St. Michael,Ahlen/Westf. Abschluss: Abitur

Grundwehrdienst/Zivildienst:

6/2001 – 3/2002:	Zivildienst Tätigkeit als Pflegehilfe im Nordwestdeutschen Rheumazentrum St.-Josef-Stift in Sendenhorst

Studium und berufliche Tätigkeit:

4/2002 – 2/2004:	Studium der Humanmedizin (vorklinischer Abschnitt) an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
3/2004:	Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung (Physikum)
4/2004 – 1/2007:	Studium der Humanmedizin (klinischer Abschnitt) an der Technischen Universität in München
2/2007 – 2/2008:	Ableistung des Praktischen Jahres (PJ)
4/2008 – 6/2008:	Ablegung der zweiten Ärztlichen Prüfung
7/2008 – 1/2009:	Tätigkeit in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Nelson
Seit 2/2009:	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München