



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7306

**Molekulare Mechanismen und  
funktionelle Konsequenzen  
der WHIM-Syndrom-Mutation  
des Chemokin-Rezeptors  
CXCR4 in T-Lymphozyten**

**J. Adam**

Institut für Toxikologie und Genetik

**Mai 2007**



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7306

**Molekulare Mechanismen und funktionelle  
Konsequenzen der WHIM-Syndrom-Mutation  
des Chemokin-Rezeptors CXCR4 in T-  
Lymphozyten**

Jan Adam

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe**

**2007**

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-073068

Molekulare Mechanismen und funktionelle  
Konsequenzen der WHIM-Syndrom-Mutation  
des Chemokin-Rezeptors CXCR4 in T-  
Lymphozyten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte

DISSERTATION

von

Jan Adam

aus Malsch

Dekan: Prof. Dr. Holger Puchta

Referent: Priv.-Doz. Dr. Jonathan Sleeman

Korreferent: Prof. Dr. Margot Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.07



# Danksagung

*Allen, die mich in jedweder Form unterstützt haben:*

*Ein herzliches Dankeschön!*





# Zusammenfassung

Das WHIM-Syndrom ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, deren Ursache kürzlich auf eine Mutation des heptahelikalen Chemokinrezeptors CXCR4 zurückgeführt wurde, die zur Deletion des regulatorischen C-Terminus des Rezeptors führt. Charakteristisch ist das Auftreten verschiedenartiger Symptome wie Immunschwäche, einhergehend mit niedrigem IgG-Spiegel (Hypoglobulinämie), kutanen Warzen durch Infektion mit humanen Papillomaviren und Retention von Neutrophilen im Knochenmark, was zu niedrigen Neutrophilwerten im Blut führt (Myelokathexis).

CXCR4 und sein einziger Ligand SDF-1 $\alpha$  spielen eine wichtige Rolle für die Migration und Homöostase einer Reihe von Zellpopulationen während der Embryogenese und im Immunsystem des adulten Organismus, insbesondere in T-Lymphozyten. SDF-1 $\alpha$  leitet die T-Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen, wirkt als Costimulus in der T-Zellaktivierung und inhibiert IL-2 induzierte Proliferation zur Eindämmung der Immunantwort. Letzterer Effekt wird durch Rho A vermittelte Inhibierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Aktivierung verursacht. Außer Rho A werden zahlreiche andere Signalwege durch SDF-1 $\alpha$  aktiviert, unter anderem die Schlüsselregulatoren PLC $\gamma$ , PI3K und Calcium.

In WHIM-Syndrom-Patienten wurden Deletionen des CXCR4-C-Terminus unterschiedlicher Länge gefunden, die alle das Fehlen von Phosphorylierungsstellen gemeinsam haben, welche für die Internalisierung eine Rolle spielen. Tatsächlich zeigt CXCR4<sub>WHIM</sub> eine defekte Internalisierung. Als Folge davon ist die Signaltransduktion im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor dereguliert, was zu einer verstärkten und verlängerten Calciumantwort auf SDF-1 $\alpha$  führt.

Zur Untersuchung weiterer Auswirkungen der Mutante auf T-Zellen wurde ein Doxycyclin induzierbares *in-vitro* T-Zellmodell zur Expression von CXCR4<sub>WT</sub> bzw. CXCR4<sub>WHIM</sub> hergestellt und validiert. Funktionelle Analysen zeigten, dass CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierende Zellen eine Reihe von Parametern zeigen, die auch in anergen T-Zellen beobachtet werden: Sie reagierten nicht auf das Stoppsignal durch TCR- und Corezeptorstimulation, zeigten eine verminderte Aktivierung des TF NFAT und des Ras-Signalwegs und folglich eine verminderte IL-2-Expression und Proliferation. Die Inhibierung des Ras-Signalwegs über Rho A wurde als

Mechanismus ausgeschlossen. Stattdessen wurde ebenso wie in anergen primären T-Zellen eine erhöhte Expression von DGK gefunden, welche den Ras-Aktivator DAG inaktiviert. Spezifische Inhibierung von DGK stellte die Aktivierung des ERK-Signalwegs sowie die IL-2-Produktion wieder her. Die erhöhte DGK-Expression kann jedoch nicht alleinige Ursache der Anergie sein, da in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen auch die Aktivierung von LAT inhibiert wird, welches oberhalb von DAG in der Signalkaskade liegt.

## Abstract

# Consequences of the WHIM syndrome CXCR4 mutation in T cells

The WHIM syndrome is an autosomal dominantly inherited disease which has recently been shown to be caused by mutation of the heptahelical chemokine receptor CXCR4 leading to deletion of the regulatory C-terminus. Typical findings in patients are immunodeficiency with low IgG-levels (hypogammaglobulinemia), cutaneous warts caused by HPV infection and retention of neutrophils in the bone marrow leading to low peripheral neutrophil counts (myelokathexis).

CXCR4 and its only known ligand SDF-1 $\alpha$  play important roles during embryogenesis and in the immune system of the adult organism, particularly in T-lymphocytes. SDF-1 $\alpha$  guides T cells to the secondary lymphoid organs, acts as a co-stimulus in T cell activation and inhibits IL-2 induced proliferation to attenuate the immune response. The latter effect is triggered by Rho A mediated inhibition of Ras-Raf-MEK-ERK-activation. Besides Rho A numerous additional pathways are activated by SDF-1 $\alpha$  including the important key regulators PLC $\gamma$ , PI3K and calcium.

In WHIM syndrome patients CXCR4 C-terminal deletions of different length have been found, all missing phosphorylation sites playing a role in internalization. Indeed CXCR4<sub>WHIM</sub> shows a defect in internalization. As a consequence, signaling is deregulated leading to an enhanced and prolonged calcium answer upon SDF-1 $\alpha$  stimulation.

To explore further effects of the mutation on T-cells a Doxycyclin-inducible *in-vitro* T-cell model was generated and validated. Functional analyses showed that CXCR4<sub>WHIM</sub> expressing cells show a number of parameters that can also be observed in anergic T cells: They don't react on the stop-signal generated by TCR- and coreceptor-stimulation, they show a decreased activation of the transcription factor (TF) NFAT and of the Ras pathway and consequently an impaired IL-2 expression and proliferation. Inhibition of Ras signaling through Rho A was excluded as a relevant mechanism. Instead, like in anergic primary T cells, an enhanced expression of DGK was found leading to inactivation of the Ras-activator DAG. Specific

inhibition of DGK reconstituted activation of the ERK pathway and IL-2 production. Nevertheless, enhanced DGK expression could not be the only cause of anergy because activation of LAT upstream of DAG was also inhibited in CXCR4<sub>WHIM</sub> expressing cells.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Abstract .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	IX
Tabellenverzeichnis .....	XI
Abkürzungsverzeichnis .....	XIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF-1 $\alpha$ .....	1
1.1.1 Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 und seines Liganden SDF-1 $\alpha$ .....	1
1.1.1.1 Expression des Chemokinrezeptors CXCR4: .....	1
1.1.1.2 Expression des Liganden SDF-1 $\alpha$ :.....	2
1.1.2 Funktionen von SDF-1 $\alpha$ /CXCR4: .....	2
1.1.3 Signalwege, die die zellulären Funktionen von SDF-1 $\alpha$ nach Bindung an den Rezeptor CXCR4 vermitteln.....	4
1.1.4 CXCR4 wird nach Bindung von SDF-1 $\alpha$ über einen Arrestin abhängigen Mechanismus internalisiert .....	6
1.2 Das WHIM-Syndrom .....	7
1.2.1 Symptomatik des WHIM-Syndroms .....	7
1.2.2 Die Mutation des Gens für CXCR4 ist die Ursache des WHIM- Syndroms .....	8
1.2.3 Therapieansätze zur Behandlung von WHIM-Syndrom-Patienten.....	10
1.3 Biologie von T-Zellen .....	10
1.3.1 Entwicklung von T-Zellen.....	10
1.3.2 Aktivierung von T-Zellen während der Immunantwort .....	11
1.3.3 Signalwege der T-Zellaktivierung.....	12
1.3.4 Anergie T-Zellen .....	14
1.4 Aufgabenstellung .....	17
2 Material .....	18
2.1 Chemikalien.....	18
2.1.1 Allgemeine Chemikalien .....	18

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.2	Zellkulturchemikalien.....	20
2.1.3	Kits und sonstige Reagenzien .....	20
2.2	Plasmidkonstrukte.....	21
2.3	Oligonukleotide .....	21
2.4	Antikörper und Proteine.....	22
2.4.1	Antikörper.....	22
2.4.2	Enzyme .....	23
2.4.3	Rekombinante Proteine.....	23
2.5	Geräte und Verbrauchsmaterial .....	23
2.5.1.1	Bezeichnung .....	23
2.6	Bakterien und eukaryotische Zellen.....	25
2.6.1	Bakterien.....	25
2.6.2	Eukaryotische Zellen.....	25
2.7	Zellkultur-Medien.....	25
2.7.1	Medien zur Kultur von Bakterien.....	25
2.7.2	Medien zur Kultur eukaryotischer Zellen.....	26
2.8	Puffer und Lösungen.....	26
3	Methoden.....	29
3.1	Methoden zur Modifikation und Analyse von DNA und RNA.....	29
3.1.1	Präparation von Plasmid-DNA (Kleinmaßstab) .....	29
3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA (Großmaßstab) .....	29
3.1.3	DNA-Konzentrationsmessung .....	30
3.1.4	Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung.....	30
3.1.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	30
3.1.6	Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese .....	31
3.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels Easy-Pure Kit (Biozym) .....	32
3.1.8	DNA-Ligation .....	32
3.1.9	Mutagenese .....	32
3.1.10	Präparation zytoplasmatischer RNA .....	34
3.1.11	DNase-Verdau.....	34
3.1.12	cDNA-Synthese durch reverse Transkription.....	34

3.1.13	RT-PCR .....	35
3.2	Methoden zur Analyse von Proteinen .....	36
3.2.1	SDS-PAGE .....	36
3.2.2	Coomassie-Färbung .....	37
3.2.3	Western Blot .....	37
3.2.4	Detektion von Oberflächenproteinen im Durchflusszytometer .....	38
3.2.5	Herstellung eines GST-Fusionsproteins .....	38
3.2.6	Bestimmung der Rho-Aktivität (Rho-GTP-Affinitätspräzipitation) ...	39
3.3	Bakterien .....	40
3.3.1	Transformation elektrokompenter E. coli .....	40
3.3.2	Einfrieren transformierter Bakterien .....	40
3.4	Eukaryotische Zellen .....	40
3.4.1	Kultur der humanen T-Lymphom-Zelllinie Jurkat .....	40
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl .....	40
3.4.3	Einfrieren von Zellen .....	41
3.4.4	Auftauen von Zellen .....	41
3.4.5	Transfektion von Jurkat-Zellen durch Elektroporation .....	41
3.4.6	Transfektion von Jurkat-Zellen durch Lipofektion .....	41
3.4.7	Herstellung Tetracyclin induzierbarer stabiler Klone von HA-CXCR4 WT und Mutante .....	42
3.4.8	Stimulieren der Zellen mit anti-CD3-/anti-CD28-/SDF-1 $\alpha$ - gekoppelten „beads“ .....	42
3.5	Zellbiologische Methoden .....	43
3.5.1	Messung der Proliferation durch BrdU-Inkorporation .....	43
3.5.2	Apoptose-Test .....	44
3.5.3	IL-2-ELISA .....	45
3.5.4	Chemotaxis-Test .....	45
3.5.5	Luziferase-Reporter-Test .....	46
3.5.6	Calcium-Messung .....	46
3.6	Mikroskopie .....	47
4	Ergebnisse .....	48
4.1	Herstellung eines Modells für das WHIM-Syndrom .....	48
4.1.1	CXCR4-Expression .....	49

4.2	Charakterisierung des T-Zell-Modells für das WHIM-Syndrom .....	51
4.2.1	Internalisierung .....	51
4.2.2	Calcium-Einstrom .....	52
4.3	Vergleich zellulärer Funktionen nach Aktivierung CXCR4 <sub>WT</sub> und CXCR4 <sub>WHIM</sub> exprimierender T-Zellen.....	53
4.3.1	Chemotaxis .....	54
4.3.2	Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT .....	55
4.3.3	Produktion von Interleukin-2.....	56
4.3.4	Proliferation .....	57
4.3.5	Apoptose .....	58
4.4	Der CXCR4-Antagonist AMD3100 inhibiert den Effekt von CXCR4 <sub>WHIM</sub> nicht .....	59
4.5	Einfluss der WHIM-Mutation auf Signaltransduktionsprozesse während der T-Zell-Aktivierung.....	61
4.5.1	Der ERK-Signalweg ist in CXCR4 <sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen inhibiert .....	62
4.5.1.1	Nach Induktion mit TPA.....	62
4.5.1.2	Nach Aktivierung des T-Zellrezeptors .....	63
4.5.2	Aktivität von Rho A in der Mutante.....	64
4.5.3	Der Signalweg zwischen T-Zellrezeptor und Ras.....	67
4.6	Mit der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante transfizierte Zellen weisen charakteristische Merkmale auf, die man auch in anergen T-Zellen findet .....	68
4.6.1	Diacylglycerolkinase (DGK) ist in T-Zellen, welche die WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante exprimieren, hochreguliert .....	68
4.6.2	Inhibition von DGK stellt die Signaltransduktion wieder her .....	69
4.6.3	Überbrücken der Signaltransduktion durch DGK I stellt die IL-2-Produktion nach TCR-Stimulierung wieder her .....	70
4.7	Ausbildung der Immunologischen Synapse – Vergleich zwischen CXCR4 <sub>WT</sub> und CXCR4 <sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen .....	71
4.7.1	Translokalisierung von CXCR4 zur IS.....	72
5	Diskussion .....	75
5.1	Etablierung eines <i>in-vitro</i> T-Zell-Modells für das WHIM-Syndrom.....	75



5.2 CXCR4 <sub>WHIM</sub> exprimierende T-Zellen weisen Defekte der T-Zell-Aktivierung auf .....	77
5.3 CXCR4 <sub>WHIM</sub> exprimierende T-Zellen zeigen nach TCR-Stimulierung eine gestörte Signaltransduktion.....	78
5.4 CXCR4 <sub>WHIM</sub> exprimierende T-Zellen zeigen Merkmale anererger T-Zellen	79
5.5 Ausblick.....	82
6 Literaturverzeichnis .....	84

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: SDF-1 $\alpha$ induzierte Signalwege .....	5
Abb.1.2: Signalwege der T-Zellaktivierung.....	14
Abb.4.1: CXCR4 mit in Trägern des WHIM-Syndroms gefundenen Mutationen .....	48
Abb.4.2: Expression von HA-CXCR4 WT und Mutante (Mut) in stabilen Klonen der Zelllinie Tet-On Jurkat (Auswahl; die Bezeichnungen der Klone stammen von den 96-Lochplatten, in denen sie gezogen wurden), <b>A</b> RT-PCR mit HA spezifischen Primern, GAPDH als Ladekontrolle, <b>B</b> Protein im WB, Detektion mit anti-HA <b>C</b> Protein im FACS, gefärbt mit anti-HA Alexa Fluor 488 (grau, massiv: ungefärbt, Volllinie: - Dox, gestrichelte Linie: + Dox).....	50
Abb.4.3: Internalisierung von HA-CXCR4 nach Ligandbindung, Färbung mit anti-HA Alexa Fluor 488 (grau, massiv: -, ungefärbt, Volllinie: -, gestrichelte Linie: 15 min SDF-1 $\alpha$ , gepunktete Linie: 30 min SDF-1 $\alpha$ ).....	52
Abb.4.4: Calcium-Einstrom nach Behandlung mit 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ .....	53
Abb.4.5: Verringerung der Chemotaxis nach Erhalt des Stoppsignals durch T-Zellaktivierung mit anti-CD3/CD28 (1 $\mu$ g/ml), quervernetzt mit Ziege-anti-Maus (5 $\mu$ g/ml), Signifikanz berechnet mit t-Test, * p < 0,05, n.s. nicht signifikant....	55
Abb.4.6: Aktivierung des TF NFAT 6 h nach T-Zellstimulierung (TCR) mit anti-CD3/CD28-beschichteten „beads“, Vorbehandlung für 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$ (SDF) in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Signifikanz berechnet mit t-Test, * p < 0,05 .....	56
Abb.4.7: IL-2-Produktion 18 h nach T-Zellstimulierung mit anti-CD3/CD28 (1 $\mu$ g/ml), quervernetzt mit Ziege-anti-Maus (5 $\mu$ g/ml), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$ für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Bestimmung der IL-	

---

2-Konzentration im Überstand durch IL-2-ELISA, Signifikanz berechnet mit t-Test, * p < 0,05, n.s. nicht signifikant .....	57
Abb.4.8: Induktion der Proliferation 24 h nach T-Zellaktivierung durch Beschichtung der Platte mit anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (9 µg/ml), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1α für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Signifikanz berechnet mit t-Test, * p < 0,05, n.s. nicht signifikant .....	58
Abb.4.9: Induktion von Apoptose nach T-Zellaktivierung, Bedingungen identisch Proliferations-Assay (s. Abb. 4.8), Signifikanz berechnet mit t-Test, * p < 0,05, n.s. nicht signifikant .....	59
Abb.4.10: Der CXCR4-Antagonist AMD3100 inhibiert nicht den Effekt der Mutante auf die Aktivierung von NFAT 6 h nach T-Zellstimulierung (TCR) mit anti-CD3/CD28-beschichteten „beads“, Vorbehandlung mit 10 µg/ml SDF-1α für 24 h .....	60
Abb.4.11: Der CXCR4-Antagonist AMD3100 inhibiert SDF-1α (10 ng/ml) induzierte ERK-Phosphorylierung und ist über 24 h stabil .....	61
Abb.4.12: Rho A vermittelte Inhibierung der Raf-Aktivierung durch den Rac-PAK-Signalweg .....	61
Abb.4.13: Inhibierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs nach Induktion für 10 min mit 2 ng/ml TPA, Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1α für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS .....	62
Abb.4.14: Inhibierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs nach Aktivierung des TCR für 1 min durch Quervernetzung mit Antikörpern (s. Abb.4.7), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1α für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS .....	64
Abb.4.15: Rho-GST-Affinitätspräzipitation, Inkubation der Zellen für 1 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml SDF-1α und/oder 10 min T-Zellstimulierung mit AK (s.o.) .....	66
Abb.4.16: Einfluss der Mutante auf Signalproteine zwischen TCR und Ras, T-Zellaktivierung für 1 min mit AK (s.o.), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1α für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS .....	67
Abb.4.17: mRNA-Expression von DGK, RT-PCR, 48 h Vorbehandlung mit Doxycylin .....	69

Abb.4.18: Einfluss des DGK-Inhibitors auf die Signaltransduktion, 30 min  
Behandlung mit 10  $\mu\text{mol/l}$  DGK I, 1 min TCR-Aktivierung mit Antikörpern (s.  
Abb.4.16), Vorbehandlung für 24 h mit 10 ng/ml SDF-1a in Hungermedium mit  
0,25 % FCS.....69

Abb.4.19: Einfluss von DGK I auf TCR induzierte IL-2-Produktion, 30 min  
Behandlung mit 2  $\mu\text{mol/l}$  DGK I, 18 h T-Zellaktivierung mit AK (s. Abb.4.7),  
Vorbehandlung für 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  in Hungermedium mit 0,25 %  
FCS .....70

Abb.4.20: Translokation von CXCR4 zur Immunologischen Synapse (zwischen T-  
Zelle und „bead“) .....73

Abb.5.1: Modell zur Verursachung von Anergie durch CXCR4<sub>WHIM</sub>, **A**  
Signaltransduktion in WT-Zellen, **B** Situation in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden  
Zellen .....81

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Allgemeine Chemikalien .....18

Tab. 2.2: Zellkulturchemikalien.....20

Tab. 2.3: Kits und sonstige Reagenzien .....20

Tab. 2.4: Plasmidkonstrukte .....21

Tab. 2.5: Oligonukleotide.....21

Tab. 2.6: Antikörper .....22

Tab. 2.7: Rekombinante Proteine.....23

Tab. 2.8: Geräte und Verbrauchsmaterial.....23



# Abkürzungsverzeichnis

AIDS	engl.: Acquired Immunodeficiency Syndrome
AIP4	engl.: Atrophin-1-interacting protein 4
AP-1/2	engl.: activating protein 1/2
APC	engl.: antigen-presenting cell
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
CD	engl.: clusters of differentiation
CMV	engl.: cytomegalievirus
DAG	Diacylglycerol
DGK	DAG-Kinase
DGK I	DGK-Inhibitor
Dox	Doxycyclin
EBV	Ebbstein-Barr-Virus
EK	Endkonzentration
ELC	engl.: Epstein Barr virus-induced receptor ligand chemokine
ELISA	engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	engl.: extracellular signal-regulated kinase
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
Fak	engl.: focal adhesion kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyant
GAP	engl.: guanine nucleotide activating protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDI	engl.: guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	engl.: guanine nucleotide exchange factor

## Abkürzungsverzeichnis

---

GM-CSF	engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
GST	Glutathion-S-transferase
GTP $\gamma$ S	Guanosin-3-thiotriphosphat
HA	Hämagglutinin
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
HPV	Humane Papillomaviren
HRP	engl.: horseradish peroxidase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin-2/4/5/7/10/13
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IS	Immunologische Synapse
ITAM	engl.: immunoreceptor tyrosine-based phosphorylation motifs
JAK	Janus-Kinase
JNK	Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton, Einheit der molaren Masse von Proteinen (1 kDa = 1000 g/mol)
LAT	engl.: linker for activation of T-cells
MAPK	engl.: mitogen activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MHC	engl.: major histocompatibility complex
MIP-1 $\alpha/\beta$	engl.: macrophage inflammatory protein $\alpha/\beta$
MLC	engl.: myosin light chain
NFAT	engl.: nuclear factor of activated T-cells

## Abkürzungsverzeichnis

---

Nil-2a	engl.: negative regulator of IL-2
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBSF	engl.: pre-B-cell growth-stimulating factor
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PDK1	engl.: phosphoinositide-dependent kinase 1
PH	engl.: pleckstrin homology
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB/Akt	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PMA = TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat 12-O-Tetradekaonoylphorbol-13-acetat
POD = HRP	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	engl.: regulated on activation normal T cell expressed and secreted
Rho	Ras-Homolog
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tetracyclin kontrollierter Transaktivator
SDF-1 $\alpha$	engl.: stromal cell-derived factor 1 $\alpha$
SLF	Steel-Faktor
SLP-76	engl.: SH2-domain leukocyte protein of 76 kDa

## Abkürzungsverzeichnis

---

SOS	engl.: son of sevenless
STAT	engl.: signal transducer and activator of transcription
TCR	T-Zellrezeptor
TF	Transkriptionsfaktor
TK	Tyrosinkinase
TNF- $\beta$	Tumornekrosefaktor $\beta$
TPO	Thrombopoietin
TRE	Tetracyclin response element
U	Unit (Einheit der Menge eines Enzyms nach dessen Aktivität)
WB	engl.: western blot
WHIM	engl.: warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency and myelokathexis
WT	Wildtyp
ZAP-70	engl.: $\zeta$ -chain associated protein of 70 kDa



# 1. Einleitung

## 1.1. Der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF-1 $\alpha$

Im Jahr 1996 wurden zwei Chemokinrezeptoren entdeckt, die als Corezeptoren für das HI-Virus dienen und für dessen Eindringen in die Zelle essentiell sind. Einer davon, schon bekannt unter dem Namen Fusin, wurde als Rezeptor des Chemokins SDF-1 $\alpha$  (engl.: stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ , auch CXCL12 und PBSF, engl.: pre-B-cell growth-stimulating factor) der CXC-Chemokinfamilie identifiziert, welche durch ihre zwei Cysteinreste im Abstand von einer Aminosäure charakterisiert sind. Er bekam daher die systematische Bezeichnung CXCR4 (Bleul *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996).

### 1.1.1. Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 und seines Liganden SDF-1 $\alpha$

#### 1.1.1.1. Expression des Chemokinrezeptors CXCR4:

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird schon während der Embryogenese konstitutiv exprimiert und in vielen Organen im erwachsenen Organismus wie Gehirn, Lunge, Herz, besonders in lymphoiden Organen wie Thymus, Lymphknoten, Milz, Knochenmark, außerdem auch in Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Niere (Rimland *et al.*, 1991; Federspiel *et al.*, 1993; Moepps *et al.*, 1997). Die Expression wurde auch in folgenden Zelltypen nachgewiesen: B-Vorläuferzellen, Burkitt-Lymphom-B-Zelllinien, Lymphozyten des peripheren Bluts, T-Zellen im Thymus, T-Lymphom-Zelllinien, Neutrophilen und Monocyten des peripheren Bluts, der Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa, der embryonalen Nierenzelllinie 293, Astrocyten, Mikrogliazellen, Fibroblasten und Mastzellen (Federspiel *et al.*, 1993; Nomura *et al.*, 1993; Loetscher *et al.*, 1994; Heesen *et al.*, 1996; D'Apuzzo *et al.*, 1997; Heesen *et al.*, 1997; Moepps *et al.*, 1997; Tanabe *et al.*, 1997).

### 1.1.1.2. Expression des Liganden SDF-1 $\alpha$ :

Während die Expression anderer Chemokine induzierbar ist, wird SDF-1 $\alpha$  konstitutiv in vielen Organen exprimiert. Neben der Expression in stromalen Knochenmarkszelllinien findet man das Chemokin in erwachsenen Mäusen in Thymus, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Magen, Darm und Knochenmark (Tashiro *et al.*, 1993; Nagasawa *et al.*, 1994) und im Endothel der menschlichen Haut (Pablos *et al.*, 1999). Schon während der Embryogenese wird es in Gehirn, Leber, Herz und im Knochenmark in den spindelförmigen Stromazellen exprimiert (Nagasawa *et al.*, 1996b).

### 1.1.2. Funktionen von SDF-1 $\alpha$ /CXCR4:

Die Funktionen von CXCR4 und seinem Liganden SDF-1 $\alpha$  wurden mit zahlreichen Ansätzen *in-vivo* und *in-vitro* untersucht.

Hauptaufgabe des Chemokins SDF-1 $\alpha$  während der Embryogenese ist das Leiten verschiedener Vorläuferzellen an ihren Bestimmungsort. Der homozygote knock-out der murinen Gene für SDF-1 $\alpha$  bzw. CXCR4 ist während der späten fötalen Entwicklung letal, nur vereinzelt werden lebende Tiere geboren, die jedoch wenige Stunden nach der Geburt sterben. In SDF-1 $\alpha$  defizienten Mäusen wurde eine verringerte B-Zell-Lymphopoese und Myelopoese im Knochenmark beobachtet. Auch in der fötalen Leber finden sich weniger Prä- und Pro-B-Zellen, während die Anzahl von myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen hier normal ist. Die Zahl der T-Vorläuferzellen im Thymus ist ebenfalls normal. Die Mäuse sterben perinatal, was durch eine gestörte Bildung verschiedener Organe erklärt werden kann. Die Mäuse weisen eine Fehlbildung des ventrikulären Septums des Herzens (Nagasawa *et al.*, 1996a) sowie der Blutgefäße des Gastrointestinaltrakts (Tachibana *et al.*, 1998) auf. Eine Fehlbildung des Cerebellums lässt auf eine Beteiligung von SDF-1 $\alpha$  an der Neurogenese schließen (Ma *et al.*, 1998). Der Grund für die Fehlbildungen der Mäuse könnte eine gestörte Einwanderung der Vorläuferzellen in die entsprechenden Organe sein, da SDF-1 $\alpha$  eine chemotaktische Wirkung auf viele Zelltypen hat.

Dies wurde in Zebrafischembryos in der Tat für verschiedene Zelltypen im lebenden Tier beobachtet. So werden Keimzellen (Doitsidou *et al.*, 2002; Knaut *et al.*, 2003), Sensorzellen des Lateralorgans (Li *et al.*, 2004) und retinale Axone (Li *et al.*, 2005) durch SDF-1 $\alpha$  an ihren Bestimmungsort geleitet. Bei einem „antisense knock-

down“ von SDF-1 $\alpha$  oder CXCR4 oder ektopischer Expression von SDF-1 $\alpha$  zeigen die Zellen jeweils zufällige Migration und werden von ihrem Weg abgelenkt.

Der drastische Phänotyp SDF-1 $\alpha$  defizienter Mäuse und die Tatsache, dass CXCR4-defiziente Mäuse einen sehr ähnlichen Phänotyp aufweisen (Ma *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998), spricht für eine monogame Beziehung zwischen Chemokin und Rezeptor, die man bei anderen Chemokinen nicht findet. In der Tat sind bis heute keine anderen Liganden für den Rezeptor CXCR4 bekannt.

Ein Interesse an den physiologischen Funktionen von SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 in T-Zellen wurde durch die Entdeckung geweckt, dass CXCR4 als Corezeptor des HIV den Eintritt T-troper Virusstämme in T-Zellen vermittelt (Feng *et al.*, 1996) (Berson *et al.*, 1996). Aufgrund der fötalen Letalität der knock-out-Mäuse können jedoch die Folgen des Funktionsverlusts von CXCR4/SDF-1 $\alpha$  auf die postnatale T-Zell-Entwicklung und -Funktion nicht in diesen Modellen untersucht werden.

Experimente mit chimären Mäusen, die nach Bestrahlung mit CXCR4-/- Knochenmarks- oder fötalen Leberzellen rekonstituiert wurden, weisen auf eine Funktion des Chemokins in der Expansion von T-Vorläuferzellen im Thymus hin. Dreifach negative Donor-T-Vorläuferzellen und alle nachfolgenden T-Zellstadien waren im Thymus signifikant weniger vertreten als deren myeloide Vorläuferzellen (Ara *et al.*, 2003). Auch im Immunsystem des erwachsenen Organismus spielt SDF-1 $\alpha$  eine wichtige Rolle. CXCR4 ist auf naiven T-Zellen exprimiert und wird nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation im Verlauf der Immunantwort hochreguliert (Bennett *et al.*, 2001) (Kobayashi *et al.*, 2004), wodurch die Sensitivität gegenüber dem Liganden zunimmt. Es ist auch auf Gedächtnis-T-Zellen exprimiert, wobei hier die Level etwas niedriger sind als auf naiven T-Zellen (Bleul *et al.*, 1997). SDF-1 $\alpha$  funktioniert als ein sehr effektives Chemoattraktans für T-Zellen. (Bleul *et al.*, 1996) und leitet zentrale T-Gedächtniszellen auf ihrem Weg zu den Lymphknoten und Peyerschen Plaques (Okada *et al.*, 2002; Scimone *et al.*, 2004).

SDF-1 $\alpha$  wirkt costimulatorisch bei der T-Zellaktivierung in Bezug auf Proliferation und Produktion von IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 (Nanki and Lipsky, 2000, 2001; Molon *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006). Interessanterweise hat es im Gegensatz dazu einen inhibierenden Effekt auf die IL-2 induzierte Proliferation von aktivierten T-Zellen während der späten Immunantwort (Cramer *et al.* submitted).

SDF-1 $\alpha$  könnte auch eine Rolle in der Homöostase von T-Gedächtniszellen spielen, indem IL-7 und IL-15 induzierte Proliferation auf niedrigem Niveau gehalten wird (Surh and Sprent, 2005). CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen, welche die Homöostase der peripheren T-Zellen regeln, zeigen eine hohe Expression von CXCR4 (Zou *et al.*, 2004) und eine hypoproliferative Antwort auf Stimulierung mit IL-2 (Bensinger *et al.*, 2004), was ebenfalls für eine Inhibierung des mitogenen IL-2-Signals durch SDF-1 $\alpha$  spricht.

Nach der Aktivierung des T-Zellrezeptors wird die Expression von CXCR4 auf Ebene der Transkription jedoch zunächst herunterreguliert und später durch den Einfluss von IL-4 wieder erhöht (Abbal *et al.*, 1999). Im Zusammenspiel mit anderen Signalen hat SDF-1 $\alpha$  damit möglicherweise die Funktion, die klonale Expansion nach T-Zellaktivierung einzudämmen und so eine überschießende Immunantwort zu verhindern.

Auch für andere Zellen des Immunsystems ist SDF-1 $\alpha$  von Bedeutung. Es hat einen großen Einfluss auf die Hämatopoese. So stimuliert es das Wachstum von Prä-B-Zellen und verstärkt ihre proliferative Antwort auf Interleukin-7 (IL-7) (Nagasawa *et al.*, 1994). Es unterstützt das Überleben myeloider Vorläuferzellen, das durch die Zytokine GM-CSF, SLF und TPO vermittelt wird (Lee *et al.*, 2002). Es wirkt als Chemoattraktant für hämatopoetische Zellen wie Prä- und Pro-B-Zellen, nicht aber reife B-Zellen, (D'Apuzzo *et al.*, 1997) und induziert die transendotheliale Chemotaxis von Lymphozyten und Monozyten (Bleul *et al.*, 1996). Eine Besonderheit im Vergleich zu anderen Chemokinen ist, dass SDF-1 $\alpha$  auch die Migration von nicht-hämatopoetischen Zellen, nämlich Astrogliazellen und Astrozyten induziert (Tanabe *et al.*, 1997).

### **1.1.3. Signalwege, die die zellulären Funktionen von SDF-1 $\alpha$ nach Bindung an den Rezeptor CXCR4 vermitteln**

Bei dem Chemokinrezeptor CXCR4 handelt es sich um einen heptahelikalen Transmembranrezeptor, der an die heterotrimeren G-Proteine gekoppelt ist. SDF-1 $\alpha$  aktiviert durch Bindung an CXCR4 zahlreiche Signalwege in der Zelle, von denen einige in Abb. 1.1 dargestellt sind (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung aller Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen verzichtet; entnommen aus M. Cramer, Dissertation, 2005). CXCR4 dimerisiert nach

## 1. Einleitung

Ligandbindung und wird zunächst durch die JAK2/3 Rezeptortyrosinkinasen an Tyrosin 157 in der zweiten intrazellulären Schleife phosphoryliert (Ahr *et al.*, 2005). Dadurch wird wiederum die Phosphorylierung von JAK2/3, möglicherweise durch Shp1, und STAT1/2/3/5 ermöglicht. Voraussetzung für die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs ist Binden von  $G_{\alpha t}$  an den Rezeptor (Vila-Coro *et al.*, 1999), was wiederum von der Tyrosinkinaseaktivität von JAK abhängt (Soriano *et al.*, 2003). Durch Dissoziation der  $\alpha$ - von der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit nach Binden an den Rezeptor werden die kleinen G-Proteine aktiviert. Davon abhängig sind die Aktivierung von PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) und des zentralen Signalmoleküls PLC- $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ). PLC- $\gamma$  produziert  $IP_3$  (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerin).  $IP_3$  führt zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium, welches zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Durch die Aktivierung von Pyk2 durch PKC erfolgt die transiente Induktion des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs (Lev *et al.*, 1995; Ganju *et al.*, 1998). Die Aktivierung von PI3K führt zur Induktion von PKB/Akt (Proteinkinase B) und Signalmolekülen wie z. B. Crk, Paxillin und Fak, welche auch eine Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts spielen, einer Voraussetzung für Zellmigration (Ganju *et al.*, 1998). Weiterhin wird durch SDF-1 $\alpha$  die Aktivierung kleiner GTPasen der Rho-Familie induziert, die ebenfalls einen Einfluss auf das Zytoskelett haben. So aktiviert SDF-1 $\alpha$  Rho A, welches wiederum die Kinase ROCK

aktiviert. Davon abhängig wird die leichte Kette von Myosin (MLC) durch MLC-Kinase phosphoryliert (Vicente-Manzanares *et al.*, 2002). Das führt zur Ausbildung von Aktin-Myosin-Filamenten, welche durch Kontraktion zur Migration der Zelle beitragen.

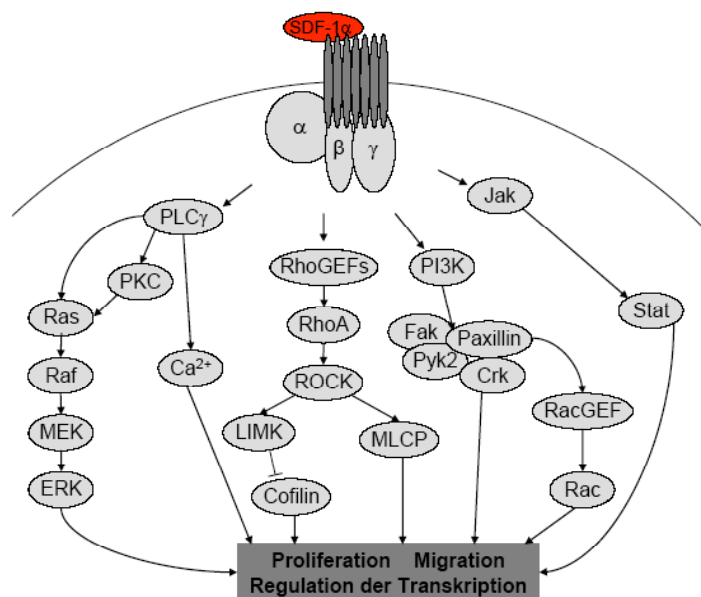


Abb. 1.1: SDF-1 $\alpha$  induzierte Signalwege

Der PI3K-Akt- und der ERK-Signalweg regulieren die Transkription von verschiedenen, u. a. antiapoptotischen Genen und tragen so zu zellulären Prozessen wie Proliferation und Überleben bei. Beide Signalwege üben auch antiapoptotische Wirkung durch direkte Inaktivierung proapoptotischer Proteine wie BAD aus (Suzuki *et al.*, 2001). Interessanterweise spielt die Interaktion von CXCR4 mit ZAP-70 und dem T-Zellrezeptor eine Rolle bei der Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs, des Calciumeinstroms und von Transkriptionsfaktoren sowie der Vermittlung von Migration (Ticchioni *et al.*, 2002; Kremer *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2006).

### **1.1.4. CXCR4 wird nach Bindung von SDF-1 $\alpha$ über einen Arrestin abhängigen Mechanismus internalisiert**

Da der Rezeptor CXCR4 als Corezeptor für den Eintritt des HI-Virus in die Zelle dient (Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996), wurde seine Internalisierung ausgiebig untersucht. SDF-1 $\alpha$  verhindert die Infizierung der Zelle mit HIV, entweder durch sterische Hinderung der Bindung des Virusoberflächenproteins gp120 an CXCR4 oder weil durch SDF-1 $\alpha$  induzierte Internalisierung der Rezeptor von der Oberfläche verschwindet (Amara *et al.*, 1997).

Vor der Internalisierung von CXCR4 erfolgt die Desensitivierung, d. h. eine weitere oder erneute Signaltransduktion wird verhindert. Dabei wird der Rezeptor zunächst durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) im zytoplasmatischen C-Terminus phosphoryliert, dann folgt die Bindung von Arrestin-2 und -3, wodurch der Rezeptor von den trimeren G-Proteinen abgekoppelt und die Internalisierung eingeleitet wird (Haribabu *et al.*, 1997; Krupnick and Benovic, 1998; Orsini *et al.*, 1999; Ferguson, 2001). Der Rezeptor wird über Clathrin bemantelte Einstülpungen der Zellmembran internalisiert, die sich durch Mithilfe von Dynamin von der Membran lösen und so zum Mikropinozytosevesikel werden. Dabei interagieren die Arrestine als Adaptermoleküle für Clathrin (Goodman *et al.*, 1996), AP-2 (Laporte *et al.*, 1999) und Phosphatidylinositole (Gaidarov *et al.*, 1999). Nach der Endozytose kann der Rezeptor entweder wieder an die Zelloberfläche gebracht oder abgebaut werden. Für die Phosphorylierung und Endozytose von CXCR4 sind zwei Serinreste (S338, S339) und ein Dileucinmotiv (I328, L329) im zytoplasmatischen C-Terminus essentiell. Drei Lysinreste im selben Bereich bilden ein Ubiquitylierungsmotiv,

welches jedoch nicht für die Internalisierung sondern die Degradierung gebraucht wird (Marchese and Benovic, 2001). In der Tat beobachtet man Ubiquitinylierung an dieser Stelle durch die E3 Ubiquitinligase AIP4, woraufhin der Rezeptor nach mehreren Ubiquitinylierungs- und Deubiquitinylierungsschritten der lysosomalen Degradation zugeführt wird (Marchese *et al.*, 2003). Wird der Rezeptor nach der Endozytose dephosphoryliert, wird er zur Zellmembran zurück transportiert. Diesen Prozess nennt man Resensitivierung (Krueger *et al.*, 1997).

Interessanterweise beobachtet man auch eine Internalisierung von CXCR4 nach Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster PMA, der PKC aktiviert. Der Mechanismus der PMA stimulierten Internalisierung ist jedoch nicht Arrestin abhängig und unterscheidet sich damit von der SDF-1 $\alpha$  induzierten CXCR4-Internalisierung. Diese Form der Internalisierung könnte durch direkte Phosphorylierung des Rezeptors oder einer GRK durch PKC induziert werden (Orsini *et al.*, 1999).

## 1.2. Das WHIM-Syndrom

Beim WHIM-Syndrom handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Krankheit mit einer charakteristischen Kombination von Symptomen. WHIM ist ein Akronym für Warzen, Hypogammaglobulinämie, Immundefizienz und Myelokathexis (Wetzler *et al.*, 1990). Die Beschreibung eines gemeinsamen Auftretens mehrerer dieser Symptome erfolgte erstmals im Jahr 1964 (Krill *et al.*, 1964; Zuelzer, 1964).

### 1.2.1. Symptomatik des WHIM-Syndroms

Die in der Literatur beschriebenen Fälle lassen auf eine dominante Vererbung schließen. Der klinische Verlauf ist in der Regel gutartig. Die Patienten zeigen eine Immunschwäche, die sich in wiederkehrenden Infektionen der Atemwege (Sinusitis, Tonsillitis, Mittelohrentzündung und Lungenentzündung) manifestiert. Es besteht eine besondere Anfälligkeit für Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV). Diese rufen Verrucosis vulgaris mit bis zu hunderten von kutanen Warzen, Condylomata acuminata und cervikale Papillomatose hervor, welche in der Folge auch zu Dysplasien führen können (Gorlin *et al.*, 2000). Infolgedessen haben WHIM-Syndrom-Patienten ein erhöhtes Risiko, an bestimmten Krebsarten wie z. B. einem Cervixkarzinom zu erkranken. Möglicherweise besitzen WHIM-Syndrom-Patienten auch eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit dem Epstein-Barr-

Virus (EBV), denn es wurde über zwei Fälle EBV assoziierter Lymphome in WHIM-Syndrom-Patienten berichtet (Chae *et al.*, 2001; Imashuku *et al.*, 2002).

Laboruntersuchungen von peripherem Blut und Knochenmark ergeben typische Befunde in Patienten. Diese zeigen meist eine Hypogammaglobulinämie mit niedrigen Werten von Immunglobulin G (IgG) im Serum. Myelokathexis beschreibt eine chronische, nicht-zyklische Neutropenie gepaart mit hyperzellulärem Knochenmark. Grund dafür ist eine defekte Auswanderung der reifen neutrophilen Granulozyten ins periphere Blut. Die Neutrophilen im Knochenmark weisen Anzeichen von Apoptose auf: hypersegmentierte Nuklei und zahlreiche kleine zytoplasmatische Vakuolen (Gorlin *et al.*, 2000). Die peripheren Neutrophilen zeigen hingegen eine verminderte Apoptoserate nach Stimulierung mit SDF-1 $\alpha$  (Taniuchi *et al.*, 2005; Sanmun *et al.*, 2006). Ihre phagozytotische und bakterizide Funktion ist nicht beeinträchtigt. Auch die Werte der anderen weißen Blutkörperchen im Blut sind niedrig, wobei B-Zellen im Verhältnis unter- und Natürliche Killerzellen überrepräsentiert sind, während der Anteil an T-Zellen normal ist. Aus Patienten isolierte Leukozyten zeigen eine verminderte proliferative Antwort auf T- und B-Zellmitogene. Gegenüber Tests mit Hautantigenen verhalten sich die Patienten anerg. Trotzdem bilden die Patienten normale Mengen an spezifischen Antikörpern nach verschiedenen Impfungen. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Patienten Probleme haben, nach Impfung eine dauerhafte Immunität aufzubauen (Wetzler *et al.*, 1990; Tarzi *et al.*, 2005).

### **1.2.2. Die Mutation des Gens für CXCR4 ist die Ursache des WHIM-Syndroms**

Erst 2003 konnte die Ursache der Erkrankung mit der Mutation eines Gens in Zusammenhang gebracht werden. Hernandez *et al.* konnten in einem Autosomen-Screen der Mitglieder drei verschiedener Stammbäume, die Träger der Krankheit waren, den veränderten Genort auf Chromosom 2 festlegen und schließlich den Chemokinrezeptor CXCR4 als heterozygot mutiertes Protein identifizieren. Damit ist das WHIM-Syndrom die erste menschliche Krankheit, die auf Mutation eines Chemokinrezeptors zurückzuführen ist. Es zeigte sich, dass die drei Mutationen der drei Familien verschieden waren, jedoch alle zu einer Deletion von 10, 14, respektive



19 Aminosäuren des zytoplasmatischen C-Terminus des Proteins führten (Hernandez *et al.*, 2003).

Durch die Deletion des C-Terminus von CXCR4 fehlen mehrere Phosphorylierungsstellen (S338, S339), die eine Rolle bei der Internalisierung spielen (s. Abschnitt 1.1.4). In der Tat wurde in mehreren Untersuchungen eine verminderte Internalisierung nach Ligandbindung in primären T-Zellen (Balabanian *et al.*, 2005) und B-Zellen (Hernandez *et al.*, 2003) von Patienten sowie in mit der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante transfizierten CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen und Erythroleukämiezellen (Kawai *et al.*, 2005) gefunden. Bereits vorher wurde gezeigt, dass eine Deletion von 33 Aminosäuren des C-Terminus von CXCR4 zu defekter Internalisierung führt (Haribabu *et al.*, 1997). Als Folge der gestörten Internalisierung wird die Desensitivierung des Rezeptors aufgehoben, was durch Aktinpolymerisationsexperimente in T-Zellen gezeigt wurde. Dabei induziert SDF-1 $\alpha$  die Polymerisation von monomerem Aktin in F-Aktinfilamenten. Eine erneute Stimulierung mit SDF-1 $\alpha$  nach 2 min löst auf Grund der Desensitivierung in Wildtyp (WT) T-Zellen keine erneute Aktinpolymerisation aus, was hingegen in T-Zellen aus WHIM-Syndrom-Patienten der Fall ist. Ebenso führt der mutierte Rezeptor zu einer erhöhten basalen Aktivität der kleinen G-Proteine und deren stärkerer Aktivierung nach Ligandbindung, was durch die Fähigkeit, GTP $\gamma$ S zu binden, gemessen wurde. Desweiteren wurde eine verstärkte chemotaktische Antwort Neutrophiler und T-Zellen auf SDF-1 $\alpha$  gefunden, nicht jedoch auf andere Chemokine (Balabanian *et al.*, 2005). Uneinigkeit besteht in Bezug auf eine verstärkte und verlängerte Calcium-Antwort auf Stimulierung mit SDF-1 $\alpha$ . Während diese in Lymphoblastoidzellen (Hernandez *et al.*, 2003) und mit der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante transfizierten humanen Stammzellen und der hämatopoetischen Zelllinie K562 (Kawai *et al.*, 2005) auftraten, wurde in primären T-Zellen aus WHIM-Syndrom-Patienten kein Unterschied zu WT Zellen gefunden (Gulino, 2003).

Der durch die WHIM-Mutation hervorgerufene Defekt in der Internalisierung des Rezeptors führt also zu einer Verstärkung der Signaltransduktion von SDF-1 $\alpha$  durch CXCR4 und der dadurch vermittelten Zellfunktionen wie Chemotaxis. Damit lässt sich sowohl die dominante Natur der Mutation als auch das Zurückhalten der Neutrophilen im Knochenmark erklären, da Endothel- und Stromazellen des Knochenmarks hohe Konzentrationen an SDF-1 $\alpha$  sekretieren und so die CXCR4

exprimierenden Zellen anlocken und dort festhalten. Das spielt eine Rolle bei der Kolonisierung des Knochenmarks mit hämatopoetischen Vorläuferzellen aus der fötalen Leber. Neutrophile, die ins Blut auswandern, regulieren CXCR4 und damit ihre Sensitivität für SDF-1 $\alpha$  herunter. Die erhöhte Aktivität der CXCR4-Mutante führt hingegen zu einer verstärkten Retention der Neutrophilen im Knochenmark. Erhöhte Blutspiegel von inflammatorischen Chemokinen wie CXCL8 und CCL2 sowie G-CSF (engl.: granulocyte colony stimulating factor) während einer Infektion wirken der Knochenmarksretention von Granulozyten durch die Hyperaktivität des Rezeptors CXCR4 entgegen und führen zu einer vorübergehenden Erhöhung der Leukozytenzahl im Blut (Gulino, 2003). Dies erklärt, warum der klinische Verlauf relativ milde ist.

### **1.2.3. Therapieansätze zur Behandlung von WHIM-Syndrom-Patienten**

Die verschiedenen therapeutischen Ansätze, die bei WHIM-Syndrom-Patienten angewandt wurden, machen sich den Effekt von Substanzen zunutze, welche der Aktivität von CXCR4 entgegen wirken. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass solche Substanzen, wie CXCR4-Antagonisten (Liles *et al.*, 2005), der G-Proteininhibitor Pertussistoxin (Papayannopoulou *et al.*, 2003) und G-CSF (Petit *et al.*, 2002; Levesque *et al.*, 2003) zum Auflösen der Myelokathexis und Erhöhung der peripheren Leukozytenzahl führen. Durch intravenöse Gabe von IgG konnte die Häufigkeit auftretender Pneumonien verringert werden (Wetzler *et al.*, 1990). Möglicherweise könnten auch CXCR4-Inhibitoren Verwendung finden, welche für die Behandlung von AIDS entwickelt wurden, sofern diese auch den mutierten Rezeptor inhibieren.

## **1.3. Biologie von T-Zellen**

### **1.3.1. Entwicklung von T-Zellen**

Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks. Während B-Zellen sich im Knochenmark (engl.: bone marrow) entwickeln, wandern einige lymphatische Vorläuferzellen in den Thymus und entwickeln sich zu T-Zellen. Dabei durchlaufen sie verschiedene Differenzierungsstadien, welche durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 in doppelnegativ und doppelpositiv, später in einzelpositiv unterschieden

werden. Eine feinere Einteilung erfolgt durch weitere Oberflächenproteine (Singer *et al.*, 1999). Während der Reifung erfolgen die Genrekombinationen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors (TCR), was die spätere Erkennung der Vielzahl von Antigenen ermöglicht, denen der Organismus ausgesetzt sein kann. In mehreren positiven und negativen Selektionsschritten werden autoimmun reaktive und unreaktive Zellen aussortiert (Kyewski and Derbinski, 2004). Die verschiedenen Stadien der Reifung finden in unterschiedlichen Kompartimenten des Thymus statt. Die Wanderung der T-Vorläuferzellen zwischen diesen wird dabei durch verschiedene Chemokine, u. a. SDF-1 $\alpha$ , und Stadium abhängige Expression der entsprechenden Rezeptoren gesteuert (Aiuti *et al.*, 1999; Norment and Bevan, 2000; Ansel and Cyster, 2001). Die reifen T-Zellen wandern aus dem Thymus aus, zirkulieren zwischen den sekundären lymphoiden Organen und Blut- bzw. Lymphsystem, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Solange nennt man sie auch naive T-Zellen. Die Zirkulation der T-Zellen wird durch verschiedene konstitutiv exprimierte Chemokine und gewebspezifische Adhäsionsmoleküle geleitet. Dazu gehören ELC (Baekkevold *et al.*, 2001) und SDF-1 $\alpha$  (Blades *et al.*, 2002; Phillips and Ager, 2002) respektive Addressine (Jutila *et al.*, 1989). Während einer Infektion werden die T-Zellen durch inflammatorische Chemokine wie MIP-1 $\alpha$  und - $\beta$  sowie RANTES in die befallenen Gewebe gelockt (Schall *et al.*, 1990; Taub *et al.*, 1993; Nelson and Krensky, 1998).

### **1.3.2. Aktivierung von T-Zellen während der Immunantwort**

Sobald eine naive T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen trifft, welches durch den MHC-Komplex einer Antigen präsentierenden Zelle (APC) gebunden ist, stoppt die Zelle die Migration und bildet einen stabilen Kontakt mit der APC aus (Negulescu *et al.*, 1996; Dustin *et al.*, 1997). Diese sogenannte Immunologische Synapse (IS) wird über mehrere Stunden aufrechterhalten (Iezzi *et al.*, 1998; Mempel *et al.*, 2004), wozu auch Chemokine beitragen. Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 werden zur Synapse rekrutiert und verstärken vermutlich die Wechselwirkung mit der APC, welche die entsprechenden Liganden CXCR4 respektive RANTES sekretiert. Außerdem wird die Sensitivität der T-Zelle für Chemokingradienten reduziert und die T-Zellproliferation in Verbindung mit einer erhöhten Zytokinproduktion verstärkt (Molon *et al.*, 2005). Die IS enthält eine ringförmige Anordnung von TCR,

Corezeptoren und Adhäsionsmolekülen (Dustin, 2003), die Voraussetzung für die Integration der verschiedenen Signale ist. Dabei erkennen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des TCR den Antigen-MHC-Komplex und der CD3-Komplex des TCR leitet das Signal ins Zellinnere. Über verschiedene Signaltransduktionswege werden die Transkriptionsfaktoren (TF) AP-1, NF $\kappa$ B und NFAT (engl.: nuclear factor of activated T-cells) aktiviert, die teils kooperativ die Expression verschiedener Gene, vor allem Zytokine und Chemokine, aber auch Oberflächenproteine wie die  $\alpha$ -Kette des IL2-Rezeptors und CD40L initiieren. Die Transkription proapoptischer Gene wie FasL und Bim sowie des Cyclininhibitors p27kip1 wird durch Inaktivierung der Forkhead-TF inhibiert (Cantrell, 2002). Dadurch werden Proliferation und damit die klonale Expansion der T-Zelle eingeleitet, sowie die Differenzierung zu Effektorzellen, deren Funktion die Bekämpfung des Antigens ist. Dabei differenzieren CD4-positive Zellen zu T-Helferzellen, wobei zwei Typen unterschieden werden. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren hauptsächlich IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$  und induzieren eine zelluläre Immunantwort gegen Viren und intrazelluläre Parasiten, während T<sub>H</sub>2-Zellen vor allem die Zytokine Il-4, -5, -6, -10 und -13 produzieren und eine humorale Immunantwort gegen extrazelluläre Parasiten vermitteln (Romagnani, 1994; Abbas *et al.*, 1996; Santana and Rosenstein, 2003). Die CD8-positiven Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen töten (Zinkernagel, 1996). Nach der erfolgreichen Eliminierung des Antigens sterben die meisten Effektorzellen durch Apoptose, einige überleben jedoch als Gedächtniszellen und gewährleisten einen unmittelbaren Schutz vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Antigen. Man unterscheidet Effektorgedächtniszellen, deren Aufgabe die Überwachung der peripheren Gewebe ist, und zentrale Gedächtniszellen, die in den Lymphknoten zu finden sind (Sallusto *et al.*, 1999).

### 1.3.3. Signalwege der T-Zellaktivierung

Durch die Interaktion des TCR-Komplexes mit MHC-gebundenem Peptid auf der APC werden in Kooperation mit Corezeptoren wie CD28 Tyrosinkinasen (TK) der Src-, Syk- und Tek-Familie aktiviert. Die TK Lck der Src-Familie phosphoryliert die ITAM (engl.: immunoreceptor tyrosine-based phosphorylation motifs) der Signaltransduzierenden Untereinheiten des TCR (CD3 und  $\zeta$ -Kette). Der TCR wird normalerweise durch die Phosphatase CD45 im inaktiven unphosphorylierten Zustand

gehalten. Durch das Binden des MHC-Komplexes der APC an den TCR entsteht ein enger Zellkontakt, der Moleküle mit langen extrazellulären Domänen wie CD45 aus dem Bereich der IS verdrängt. Dadurch wird der TCR im aktivierten Zustand gehalten. Phosphorylierung der ITAM erlaubt das Binden der Syk-Familien-TK ZAP-70 (engl.:  $\zeta$ -chain associated protein of 70 kDa), welche durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert wird. ZAP-70 phosphoryliert dann seine Substrate, die wichtigsten sind die Adapterproteine SLP-76 und LAT (engl.: linker for activation of T-cells). Diese formen Gerüste, um verschiedene Signalmoleküle an den richtigen Orten der Zelle zusammenzuführen, und ermöglichen dadurch die Aktivierung verschiedener Signalwege (Abb. 1.2, vereinfachte Darstellung). Durch Anlagerung des Adapterproteins Grb2 an LAT wird das konstitutiv an Grb2 gebundene Protein SOS an die Membran rekrutiert und aktiviert. SOS ist ein GEF (engl.: guanine nucleotide exchange factor) für die kleine GTPase Ras, welche dadurch aktiviert wird. Durch Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs werden AP-1-TF aktiviert. LAT rekrutiert auch das Enzym PLC- $\gamma$ 1 zur Membran, welches dort durch TK der Tek-Familie aktiviert wird. PLC- $\gamma$ 1 zerlegt PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG, welche Calcium freisetzen und PKC aktivieren (vgl. Abschnitt 1.1.3). Calcium induziert unter Vermittlung von Calmodulin und Calcineurin die Aktivierung der NFAT-TF. DAG und PKC-Aktivität sind auch an der Aktivierung des Ras-Signalwegs beteiligt. Durch den Corezeptor CD28 wird ein weiteres Enzym des Phosphatidylinositolstoffwechsels aktiviert, die PI3K. Die Produkte der PI3K, PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub>, binden an PH-Domänen verschiedener Proteine, die in bestimmte Regionen der Plasmamembran rekrutiert und dort aktiviert werden. Dazu gehören PKB und PDK1, welches verschiedene Serinkinasen wie S6K1 durch Phosphorylierung aktiviert. S6K1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Proteinsynthese und der Kontrolle von Zellwachstum, während PKB T-Zellzyklusprogression und Überleben der Zelle durch Inaktivierung der Forkhead-TF kontrolliert. PKB trägt zusammen mit PKC abhängigen Signalen zur Aktivierung des TF NF $\kappa$ B bei. PIP<sub>3</sub> aktiviert auch den Rac-GEF Vav1, welcher die kleine GTPase Rac aktiviert. Zusammen mit den kleinen GTPasen Rho A und Cdc42 spielt Rac eine Rolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts, welche Voraussetzung für das Ablaufen der Signaltransduktion ist (Cantrell, 2002).

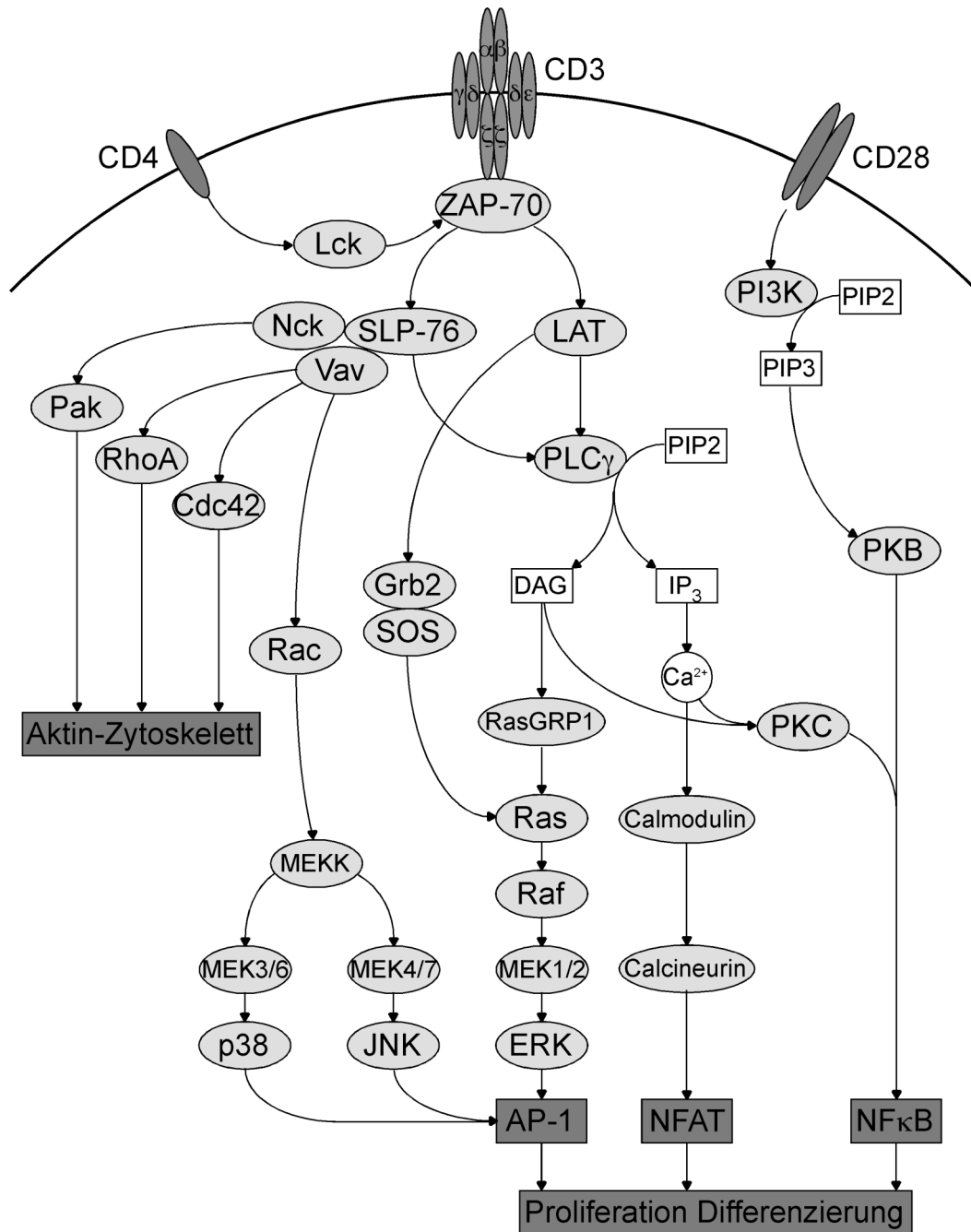


Abb. 1.2: Signalwege der T-Zellaktivierung

### 1.3.4. Anerge T-Zellen

Toleranz der T-Zellen gegenüber Selbst-Antigenen wird durch drei bekannte Mechanismen erzielt. Der wichtigste Mechanismus ist der der klonalen Elimination autoreaktiver T-Zellen während der Entwicklung im Thymus. In einem nachgeordneten Schritt inhibieren regulatorische T-Zellen überschießende und schädliche Immunreaktionen. Durch den Mechanismus der Anergie werden

autoreaktive T-Zellen, die der klonalen Elimination entgangen sind, reaktionsträge gemacht. Anergie bedeutet, dass die betreffenden T-Zellen nicht mehr durch Antigenkontakt aktiviert werden können. Der Zustand der Anergie wurde erstmalig in einem T-Zelllymphomklon beschrieben, der keine proliferative Antwort auf ein Hämagglutininpeptid des Influenzavirus zeigte (Lamb *et al.*, 1983). Wie der Zustand der Anergie entsteht, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise spielen mehrere unterschiedliche Mechanismen hierbei eine Rolle (Arnold *et al.*, 1993).

Es zeigte sich, dass Anergie immer dann auftritt, wenn der TCR in Abwesenheit costimulatorischer Signale aktiviert wird, entweder durch Antigenpeptide und MHCII-Komplex (Jenkins and Schwartz, 1987; Quill and Schwartz, 1987), durch immobilisierte CD3-Antikörper (Jenkins *et al.*, 1990) oder durch Behandlung mit Concanavalin A (Mueller *et al.*, 1989). Partielle Antigenpeptide induzieren sogar in der Gegenwart costimulatorischer Signale Anergie (Sloan-Lancaster *et al.*, 1993). Zur vollen T-Zellaktivierung ist ein Zusammenspiel der TF AP-1, NF $\kappa$ B und NFAT erforderlich (vgl. Abschnitt 1.3.2). In den eben beschriebenen Methoden, T-Zellen durch Aktivierung des TCR in Abwesenheit costimulatorischer Signale anerg zu machen, ist dieses nicht mehr gegeben. T-Zellen werden auch anerg, wenn man den TF NFAT in Abwesenheit von AP-1-Aktivierung für längere Zeit stimuliert. Dies kann durch Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch Calcineurin-Aktivierung oder Ionomycin bewirkt werden. Während NFAT im Zusammenspiel mit AP-1 die Transkription verschiedener Gene in der produktiven Immunantwort induziert, aktiviert NFAT alleine eine andere Gruppe von Genen, die für negative Regulatoren der T-Zellaktivierung kodieren. Darunter sind Tyrosinphosphatasen, Proteasen und E3 Ubiquitinligasen, die zentrale Moleküle der T-Zellsignalkaskaden, z. B. PKC- $\theta$  und PLC- $\gamma$ 1, inaktivieren respektive degradieren. Folglich kann man die Induktion von Anergie mit dem Calciumchelator EGTA oder dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A inhibieren (Macian *et al.*, 2002; Heissmeyer *et al.*, 2004). Außerdem wurde eine größere Menge des negativ regulierenden Faktors Nil-2a in anergen T-Zellen gefunden (Becker *et al.*, 1995), welcher AP-1 induzierte Transaktivierung von Reportergenen inhibiert (Williams *et al.*, 1991).

Fehlende Aktivierung von AP-1 nach TCR-Stimulierung anergischer T-Zellen führt dazu, dass u. a. das IL-2-Gen nicht transkribiert wird (Kang *et al.*, 1992) und daher kein IL-2, ein wichtiger Bestandteil der Initiierung der Immunantwort, produziert

wird (Otten and Germain, 1991). Ursache dafür sind fehlende Aktivierung von Ras (Fields, 1996) und der ERK- und JNK-MAP-Kinase-Signalwege (Li *et al.*, 1996). Kürzlich wurde gefunden, dass die anergen Zellen durch Expression von dominant aktivem Ras wieder IL-2 nach T-Zellaktivierung produzieren. In derselben Studie wurde entdeckt, dass die Expression von DAG Kinasen (DGK) in anergen T-Zellen hochreguliert ist. Diese prozessieren DAG zu Phosphatidylsäure und verhindern somit durch Absenken des DAG-Spiegels die Aktivierung von Ras. Durch zweifache Überexpression von DGK- $\alpha$  konnte in T-Zellen ein aneuger Zustand hergestellt werden, während ein DGK-Inhibitor die IL-2-Produktion nach TCR-Stimulierung dosis abhängig revertieren konnte. Daraus lässt sich schließen, dass DGK eine wichtige Rolle in der negativen Regulierung der T-Zellaktivierung spielen. Dies wird auch durch Daten aus DGK- $\alpha$  defizienten Mäusen gestützt, deren T-Zellen weitgehend resistent gegen Anergie sind (Zha *et al.*, 2006).

Interessanterweise kann man die Induktion von Anergie in murinen T-Zellen noch verhindern, wenn das costimulatorische Signal bis zu 2 h nach Stimulierung der T-Zellen erfolgt (Mueller *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1992) oder der IL-2-Rezeptor durch Quervernetzung mit Antikörpern aktiviert wird (Boussiotis *et al.*, 1994). Umgekehrt kann Blockieren des IL-2-Signals durch Antikörper (DeSilva *et al.*, 1991) oder Auswaschen von IL-2 (Beverly *et al.*, 1992) nach voller T-Zellstimulierung zu Anergie führen. Das spricht für eine Inaktivierung negativ regulierender Faktoren bzw. Aktivierung positiv regulierender Faktoren durch IL-2. In humanen T-Zellen reicht Zugabe von IL-2 alleine nicht aus, um die Anergie aufzuheben. Hier muss zusätzlich mit CD2-Antikörper stimuliert werden (Boussiotis *et al.*, 1994).

T-Zelltoleranz kann auch durch IL-10 induziert werden, wodurch die Expression des IL-2-Rezeptors defekt wird und folglich die Anergie nicht durch IL-2-Stimulierung revertiert werden kann (Groux *et al.*, 1996). Es wurde gezeigt, dass IL-10 die Expression costimulatorischer Moleküle und proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen herunter reguliert (Ding *et al.*, 1993) und so Mitogen induzierte Proliferation in T-Zellen inhibieren kann (Ding and Shevach, 1992).

Die künstliche Stimulation von Anergie könnte bei Autoimmunkrankheiten oder Organtransplantation von Nutzen sein.



## 1.4. Aufgabenstellung

Da WHIM-Syndrom-Patienten eine Immunschwäche zeigen und T-Zellen eine Hauptrolle in der Vermittlung der Immunantwort spielen, sollten die Auswirkungen der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutation auf T-Zell-Funktionen untersucht und die zu Grunde liegenden Mechanismen aufgeklärt werden.

Da der Zugang zu Material von Patienten sehr eingeschränkt ist, sollte hierzu ein Zellkulturmodell erstellt werden. Hierzu wurde eine Variante der humanen T-Lymphomzelllinie Jurkat verwendet, welche den reversen Tetracyclin kontrollierten Transaktivator (rtTA) in sich trägt und somit die induzierte Expression stabil integrierter Gene erlaubt, welche unter der Kontrolle des „Tetracyclin response element“ (TRE) stehen. Die Zelllinie wurde stabil mit WT CXCR4 bzw. der WHIM-Syndrom-Mutante von CXCR4 unter Kontrolle des TRE transfiziert und Klone selektiert und evaluiert. Die Experimente wurden dann mit geeigneten Klonen durchgeführt.

Bei der Untersuchung der T-Zell-Funktionen in WT bzw. CXCR4<sub>WHIM</sub> transfizierten Klonen wurde ein besonderes Augenmerk auf die T-Zellaktivierung gerichtet, welche die Immunantwort einleitet. Gibt es Defekte in der Aktivierung? Welche Aspekte sind betroffen: Stoppsignal, Ausbildung der IS, Signalmoleküle/-wege (Lck, ZAP-70, LAT, MAPK, Rho A), TF (NFAT), IL-2-Produktion, Proliferation, Apoptose?

Da die Mutante verschiedene Merkmale der Anergie zeigte, warf dies im Verlauf meiner Doktorarbeit die Frage auf, wie diese verursacht wird. Spielt der Signalweg über Rho A eine Rolle, der in WT-Zellen IL-2 induzierte Proliferation durch Inhibierung des ERK-Signalwegs verhindert? Oder finden sich Analogien zu in der Literatur beschriebenen Mechanismen der Erzeugung von Anergie?

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien lagen in der höchst möglichen Reinheitsstufe vor. Für wässrige Lösungen wurde Wasser verwendet, das zuvor entsalzt wurde. Die Lösungen wurden in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert bzw. steril filtriert.

#### 2.1.1. Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
30% Acrylamid	Roth, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(4-butansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
5x Passive Lysis Buffer	Promega, Mannheim
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Taufkirchen
Agarose	peQLab, Erlangen
AMD3100	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Otto Nordwald KG, Hamburg
Beetle Luciferin	Promega, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coelenterazin	Biosynth, Schweiz
Complete-Tabletten, EDTA-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant-Blau G-250	Roth, Karlsruhe
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Promega, Mannheim
Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	Promega, Mannheim
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	Promega, Mannheim
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	Promega, Mannheim

## 2. Material

Diacylglycerol Kinase Inhibitor II (R59949)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Doxycyclin	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Fluo-4 AM	Invitrogen, Karlsruhe
G418	PAA, Pasching
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycylglycin (GlyGly)	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma, Taufkirchen
Ionomycin	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Promochem, Wesel
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe

## 2. Material

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Phenol (Tris-gesättigt)	Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Pluronic F-127	Sigma, Taufkirchen
Puromycin	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Pasching
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Sulfinpyrazon	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe

Tab. 2.1: Allgemeine Chemikalien

### 2.1.2. Zellkulturchemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (engl.: phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2.2: Zellkulturchemikalien

### 2.1.3. Kits und sonstige Reagenzien

<b>Kit/Reagens</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Annexin V Apoptosis Detection Kit	Santa Cruz, Heidelberg
BenchMark Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche Diagnostics, Mannheim

## 2. Material

BD OptEIA Set Human IL-2	BD Biosciences, Heidelberg
DNA-Leiter-Mix	peQLab, Erlangen
JetPEI transfection reagent	Biomol, Hamburg
PeqGOLD Prestained Protein Marker	peQLab, Erlangen
Polybead polystyrene 6.0 micron Microspheres	Polysciences, USA
Qiagen Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
EasyPure DNA Purification Kit	Biozym, Hessisch Oldendorf

Tab. 2.3: Kits und sonstige Reagenzien

## 2.2. Plasmidkonstrukte

Plasmid	Bezugsquelle
pcDNA-3	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3-HA-CXCR4	zur Verfügung gestellt von J.L. Benovic
pcDNA3-HA-CXCR4 $\Delta$ cyt	selbst hergestellt durch Mutagenese
pTRE-HA-CXCR4	selbst hergestellt durch Klonierung
pTRE- HA-CXCR4 $\Delta$ cyt	selbst hergestellt durch Mutagenese
pEGFP	BD Biosciences, Heidelberg
pHA-CXCR4-GFP	selbst hergestellt durch Klonierung
pHA-CXCR4 $\Delta$ cyt -GFP	selbst hergestellt durch Klonierung
pGEX-Rhotekin-RBD	zur Verfügung gestellt von M. Schwartz
pNFAT-Luc	Stratagene, USA
pCMV-Renilla	Promega, Mannheim

Tab. 2.4: Plasmidkonstrukte

## 2.3. Oligonukleotide

Die Notation erfolgte gemäß 5' nach 3'.

Primer	Sequenz
GAPDH(s)	TTCGACAGTCAGCCGGATCTTC
GAPDH(as)	CTTCTCCATGGTGGTGAAGACG
pTRE-HA-CXCR4(s)	GCCATCCACGCTGTTTTGACCT
pTRE-HA-CXCR4(as)	CGCGCTAGATTAGCTGGAGTGA
DGK(s)	GGATATCTATGGGATCAACCAGGCC

## 2. Material

DGK(as)	GATTTGGCCCATCTCAATTGCACCC
mutaCXCR4_1000(s)	CCTCTCCAAAGGAAAGTGAGGTGGACATTCATCT GTTTC
mutaCXCR4_1000(as)	GGAAACAGATGAATGTCCACCTCACTTTCCTTTG GAGAGG
mutaAgeI(s)	GATCCTCTCCAAAGGACCGGTAGGTGGACATTCA TC
mutaAgeI(as)	GATGAATGTCCACCTACCGGTCCTTTGGAGAGGA TC
mutaSTOP→AgeI(s)	GTTTTCACTCCAGACCGGTTAGAGGGCCCTATTC
mutaSTOP→AgeI(as)	GAATAGGGCCCTCTAAGCGGTCTAGGGTGAAAA C

Tab. 2.5: Oligonukleotide

## 2.4. Antikörper und Proteine

### 2.4.1. Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-MEK1 (H8)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Erk1 (K-23)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-p44/p42 MAPK (Thr 202/Tyr 204)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-LAT	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-LAT (Tyr71)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Lck	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-Src Family (Tyr416)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-ZAP-70	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-ZAP-70 (Tyr493)	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Rho A (26C4)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-HA (HA.11)	Covance (Hiss Diagnostics, FR)
Anti-HA-Alexa Fluor 488 (HA.11)	Cell Signaling, Frankfurt
Alexa Fluor 680 Anti-Maus IgG	Molecular Probes (Invitrogen, KA)

## 2. Material

Alexa Fluor 680 Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes (Invitrogen, KA)
IRDye 800 Anti-Maus IgG	Rockland (Biomol, Hamburg)
IRDye 800 Anti-Kaninchen IgG	Rockland (Biomol, Hamburg)
Anti-human CD3-FITC (UCHT-1)	Pharmingen, Heidelberg
Anti-human CD3 (UCHT-1)	Pharmingen, Heidelberg
Anti-human CD28	Pharmingen, Heidelberg
Ziege Anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg

Tab. 2.6: Antikörper

### 2.4.2. Enzyme

Alle verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), NEB (Frankfurt) und Promega (Mannheim) bezogen.

### 2.4.3. Rekombinante Proteine

Protein	Bezugsquelle
SDF-1 $\alpha$	PromoCell
GST-Rhotekin-RBD	eigene Produktion (s. Kapitel 3.2.5)

Tab. 2.7: Rekombinante Proteine

## 2.5. Geräte und Verbrauchsmaterial

2.5.1.1. Bezeichnung	Bezugsquelle
8-Kammerdeckgläser	Nunc, USA
96-Lochplatte, weiß	Greiner, Frickenhausen
Bakterien-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Bakterien-Schüttler	Infors, Bottmingen, Schweiz
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Bioruptor	Diagenode, Liège, Belgien
Branson Sonifier	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau
Brutschrank (Zellen)	Labotect, Göttingen
Discovery M120SE Ultrazentrifuge	Sorvall, Langenselbold
Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Elektrophoresekammer (DNA)	von eigener Werkstatt hergestellt
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Polymehr, Paderborn

## 2. Material

Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Elektroporator (E.coli Pulser)	BioRad, München
Elektroporator (Gene Pulser)	BioRad, München
ELx808 Ultra Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Schweiz
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACScan	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Feinwaage AE163	Mettler, Gießen
Kanülen	neoLab, Heidelberg
Konfokales Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Avanti J-20	Beckman, Stuttgart
Kühlzentrifuge Centrikon H-401	Hermle, Gosheim
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Mikroskop (ID02)	Zeiss, Jena
Netzgerät EPS 2A200	Hoefer Scientific Instruments, USA
Neubauer-Zählkammer	VWR, Bruchsal
PP-Röhrchen (15 ml)	Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
PVDF-Membran Immobilon F	Millipore, Schwalbach
Qdyssey Infrared Imager	Li-cor Biosciences, Bad Homburg
Schüttler Polymax 2040	Heidolph, Kehlheim
Semidry Blotter	H. Hölzel, Hörlkofen
Spritzen	neoLab, Heidelberg
Sterilfilter	Renner, Darmstadt
Thermocycler PTC-200	Biozym, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Z233MK	Hermle, Gosheim
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Transwell-Kammern (5 µm Porengröße)	Corning, USA
UV-Gerät Eagle Eye	Stratagene, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg



## 2. Material

VICTOR Light 1420 Luminescence Counter	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Vortex-Gerät	Bender und Hobein, Karlsruhe
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Whatman 3MM Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen (versch. Ausführungen)	Greiner, Frickenhausen

Tab. 2.8: Geräte und Verbrauchsmaterial

## 2.6. Bakterien und eukaryotische Zellen

### 2.6.1. Bakterien

BL21(DE3)pLysS  
(erhältlich bei Invitrogen, Karlsruhe) Genotyp:  
F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)  
pLysS (Cam<sup>R</sup>)

TOP10  
(erhältlich bei Invitrogen, Karlsruhe) Genotyp:  
F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-  
mcrBC)Φ80lacZ ΔM15ΔlacX74 recA1  
deoR araD139Δ(ara-leu)7697galU galK  
rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1nupG

### 2.6.2. Eukaryotische Zellen

Jurkat E6 Humane T-Lymphom-Zelllinie (Weiss et al. 1984, Sladowski et al. 1993), (bezogen von ECACC)

Jurkat-Tet-On exprimiert den reversen Tetracyclin kontrollierten Transaktivator (rtTA), (erhältlich bei Becton-Dickinson, Heidelberg)

## 2.7. Zellkultur-Medien

### 2.7.1. Medien zur Kultur von Bakterien

Agar-Platten:

1,5% Bacto-Agar in LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin

LB-Medium:

1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl

SOB:

2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl

SOC:

10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose in SOB

### 2.7.2. Medien zur Kultur eukaryotischer Zellen

Kultur-Medium für Jurkat-Zellen:

RPMI, 10% FCS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin

Kultur-Medium für Jurkat-Tet-On-Zellen:

RPMI, 10% FCS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin, 100 µg/ml G418

Kultur-Medium für Jurkat-Tet-On Zellen, die stabil mit einem pTRE-Vektor transfiziert sind:

Zusätzlich 0,3 µg/ml Puromycin

Einfrier-Medium für Jurkat- und Jurkat-Tet-On-Zellen:

RPMI, 20% FCS, 10% DMSO

## 2.8. Puffer und Lösungen

Assaypuffer (Luziferase-Assay):

2 mM ATP, 1 mM DTT in GlyGly-Puffer

Calciumbindungspuffer:

10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>

5x Coelenterazin-Lösung:

125 nM Coelenterazin in 1x Passive Lysis Buffer

Coomassie-Blau-Färbelösung:

10% Essigsäure, 0,006% Coomassie Brilliant-Blau G-250

Fixierungslösung (Coomassie):

25% Isopropanol, 10% Essigsäure

## 2. Material

---

GlyGly-Puffer:

25 mM GlyGly, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM EGTA pH 7,8

GTLB1:

50 mM Tris pH 8,0, 40 mM EDTA, 25% Saccharose, 1 mM PMSF, 1 Complete-Tablette (EDTA-frei)

GTLB2:

50 mM Tris pH 8,0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 Complete-Tablette (EDTA-frei)

5x Ladepuffer (DNA):

50% Glycerin, 50 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, Bromphenolblau

10x Laemmli-Puffer:

25 mM Tris pH 8,6, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Lösung 1 (DNA-Präparation):

50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8,0

Lösung 2 (DNA-Präparation):

0,2 M NaOH, 1 % SDS

Luziferin-Assay-Lösung:

0,2 mM Beetle Luciferin in GlyGly-Puffer

Lysepuffer (GST-Rho A-Affinitätspräzipitation):

50 mM Tris pH 7,2, 1% Triton X-100, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin

PBS-Waschpuffer:

1 mM DTT, 0,2% Tween-20 in PBS

PCI:

Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1

2x Probenpuffer:

2% SDS, 10% Glycerin, 60 mM Tris pH 6,8, 0,001% Bromphenolblau, 100 mM DTT

„Stripping“-Lösung:

62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 50 mM DTT

50x TAE:

2 M Tris, 100 mM EDTA pH 8,0, 2 M Essigsäure

10x TBS:

200 mM Tris pH 7,6, 1,4 M NaCl

## 2. Material

---

TBS-Tween:

0,2% Tween-20 in TBS

TE-Puffer:

10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TNEE:

10 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 20 mM EGTA, 1 mM EDTA

Transferpuffer (Western Blot):

192 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,01% SDS, 20% Methanol

Waschpuffer (GST-Rho A-Affinitätspräzipitation):

50 mM Tris pH 7,2, 1% Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin

## 3. Methoden

### 3.1. Methoden zur Modifikation und Analyse von DNA und RNA

#### 3.1.1. Präparation von Plasmid-DNA (Kleinmaßstab)

Eine Methode, in Bakterien transformierte und amplifizierte Plasmid-DNA zu isolieren und zu reinigen, ist die Minipräp-Methode.

Dabei wurden einzelne Bakterienkolonien, die auf einer Selektionsplatte als positiv erkannt wurden, über Nacht in je 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml) bei 37 °C (geschüttelt) hochgezüchtet. Je 1,5 ml dieser Flüssigkulturen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 4500 rpm 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen. Die Bakterien wurden in 100 µl Lösung resuspendiert und anschließend mit 200 µl alkalischer SDS-Lösung (Lösung 2) versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen und fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 150 µl Natriumacetat (3 M pH 5,2) zugegeben und nochmals gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 5 min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran 15 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Dies dient zur Sedimentation der Zellmembranen und der genomischen DNA der Bakterien, während die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung.

#### 3.1.2. Präparation von Plasmid-DNA (Großmaßstab)

Bakterien wurden in 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum über Nacht (geschüttelt) bei 37 °C kultiviert.

Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mittels des „Qiagen-Plasmid-Maxi-Kit“ entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 30 min sedimentiert und anschließend in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mg/ml RNase A) resuspendiert und darauf mit 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) versehen und 5 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 ml Puffer P3 (2,55 M Kaliumacetat). Nach

vorsichtigem Durchmischen wurde das Lysat 30 min bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde danach auf eine Ionentauschersäule gegeben, die zuvor mit Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol, pH 7,0; 0,1 % Triton X100) equilibriert worden war.

Nach der Adsorption der DNA an der Säulenmatrix wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol, pH 7.0) gewaschen und dann mit 12 ml Puffer QF eluiert. Nach Isopropanolfällung und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen.

Das Pellet wurde getrocknet und in 100-400 µl TE-Puffer aufgenommen.

#### **3.1.3. DNA-Konzentrationsmessung**

Bei der Konzentrationsbestimmung von DNA nutzt man die Absorption von DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Doppelsträngige DNA hat eine Extinktion von 1 bei einer Konzentration von 50 mg/ml. Durch die zusätzliche Bestimmung der Absorption bei 280 nm, wo Proteine absorbieren, wird die Reinheit der Probe bestimmt. Die Messung der wässrigen DNA-Probe erfolgte in UV-Küvetten und wurde in einem BioPhotometer von Eppendorf durchgeführt.

#### **3.1.4. Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung**

Die DNA wurde in 250 µl Wasser aufgenommen. Es wurden 250 µl PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 12:12:1) hinzugefügt und gründlich gemischt.

Die Phasen wurden durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 5 min getrennt. Die obere Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, wurde vorsichtig abgenommen und die DNA durch Zugabe von 25 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 1 ml Ethanol mindestens 15 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4 °C wurde die DNA getrocknet und in TE aufgenommen.

#### **3.1.5. Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Bakterien besitzen verschiedene Restriktionsenzyme zum Abbau von fremder DNA (z. B. als Abwehrmechanismus gegen Viren). Die Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA erfolgt dabei durch die Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen. Das Schneiden der erkannten DNA kann unmittelbar in der

Erkennungssequenz erfolgen. Enzyme dieses Typs werden in der molekularen Genetik verwendet.

Durch versetzte Schnitte der Einzelstränge können an den entstehenden DNA-Enden 3'- oder 5'-Überhänge erzeugt werden. Werden beide Stränge an der gleichen Position getrennt, sind die Enden glatt.

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von zehnfach konzentrierten Puffer-Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Volumen des Restriktions-Verdau betrug mindestens das Zehnfache des Volumens der zugegebenen Enzym-Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37 °C für mindestens 1 h. Die verdauten Nucleinsäuren wurden per Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

#### **3.1.6. Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese**

Nucleinsäuren besitzen durch die Ladung der Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts eine negative Gesamt-Ladung. Die DNA-/RNA-Moleküle wandern daher bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode (Pluspol).

Je nach Größe der zu trennenden Nucleinsäure-Fragmente wurden 0,6 -1,5 %ige Agarose-Gele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nachdem das Gel etwas abgekühlt war, wurde 1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gel-Volumen zugegeben, bevor es in die vorbereitete horizontale Gel-Kammer gegossen wurde. Nach dem Überschichten des auspolymerisierten Gels mit 1x TAE-Puffer wurden die mit 5x Ladebuffer versehenen Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte, je nach Gelkammergröße und Agarosegehalt des Gels bei 80 bis 100 V. Im Anschluss wurden die aufgetrennten Nucleinsäure-Fragmente mit Hilfe des sich zwischen die DNA-Stränge lagernden (interkalierenden) und fluoreszierenden Ethidiumbromids unter UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht.

#### **3.1.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels Easy-Pure Kit (Biozym)**

Die benötigte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden drei Volumina (100 mg Gel entspricht circa 100 µl) „Salt“-Puffer hinzugegeben und 5 min bei 55 °C inkubiert. Nach Zufügen von „Bind“ wurde das Gemisch 5 min bei RT inkubiert und dann 5 s bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde mit „Wash“-Lösung gewaschen und nochmals 5 s bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet wurde dann in 10 - 20 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen, 5 min bei RT inkubiert und für 1 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt.

#### **3.1.8. DNA-Ligation**

Zum Verbinden von Plasmid-DNA mit aufgereinigten DNA-Fragmenten als Insert wird ein Reaktionsansatz hergestellt, in dem die Plasmid-DNA in einem molaren Überschuss (in der Regel 3 - 5x) vorliegen sollte. Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) versetzt und in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht im Wasserbad bei 16 °C inkubiert.

#### **3.1.9. Mutagenese**

Kleinere Mutationen bis zu einigen Basenpaaren können durch gezielte Mutagenese in ein Gen eingeführt werden, welches in einen Vektor kloniert ist. Die Mutagenese ist eine PCR mit zwei 25 bis 40 bp langen Primern, die zueinander komplementär sind und in der Mitte die veränderten Nukleotide tragen. Bei der PCR lagert sich jeweils einer der Primer an jeden Einzelstrang, und danach werden beide Stränge durch die Pfu-Polymerase, welche eine Korrekturlesefunktion besitzt, komplett amplifiziert und dabei die Mutation eingeführt.



Es wurden eingesetzt:

5  $\mu$ l 10x Puffer

1  $\mu$ l Templat (10 ng/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l dNTPs (je 10 mM)

1  $\mu$ l Primermix (je 10 pmol/ $\mu$ l)

41  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

1  $\mu$ l Taq Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)

50  $\mu$ l Endvolumen

PCR-Bedingungen:

„Annealing“-Temperatur in Abhängigkeit von der Sequenz der Primer wählen.

1. 95 °C 30 s

2. 95 °C 30 s

3. 55 °C 1 min

4. 72 °C 1 min pro kb Plasmidlänge

28 - 35 Zyklen 2. - 4.

Nach der PCR wird der Reaktionsansatz mit 1  $\mu$ l 1 h bei 37 °C mit DpnI verdaut. Das Restriktionsenzym erkennt nur methylierte DNA und verdaut daher nur das Ausgangsplasmid, nicht die amplifizierte DNA mit der Mutation. 2  $\mu$ l des Verdaus wurden durch Elektroporation in *E. coli* TOP10 transformiert (s. Abschnitt 3.3.1) und auf Selektionsplatten ausplattiert.

Um die CXCR4-Mutation aus den WHIM-Syndrom-Patienten zu imitieren, wurde pcDNA3-HA-CXCR4 und pTRE-HA-CXCR4 mit dem Primerpaar mutaCXCR4\_1000 durch Mutagenese des Basenpaars 1000 ein Stoppkodon eingeführt. Zur Herstellung der GFP konjugierten CXCR4-Konstrukte wurde mit dem mutaAgeI-Primerpaar in pcDNA-HA-CXCR4 3' von CXCR4 eine Erkennungssequenz für AgeI so eingeführt, dass GFP nach der Ligation in pEGFP-N1 im selben Leserahmen wie CXCR4 war. Um die Mutante zu generieren, wurde mit den Primern mutaSTOP→AgeI in pcDNA-HA-CXCR4 gleichzeitig das Stoppkodon entfernt und danach die Umklonierung in pEGFP-N1 durchgeführt.

#### **3.1.10. Präparation zytoplasmatischer RNA**

5·10<sup>6</sup> Zellen wurden 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in 1 ml eiskaltem TNEE aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einmaligem Zentrifugieren 3 min bei 3000 rpm und 4 °C und Waschen mit 1 ml TNEE wurde erneut zentrifugiert und in 270 µl TNEE aufgenommen. Durch Zugabe von 30 µl 5% Igepal CA-630 in TNEE wurden die Zellen 5 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde 1 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in Reaktionsgefäße mit 300 µl Tris-gepuffertem Phenol und 30 µl 10% SDS überführt und gründlich gemischt. Nach Zentrifugation (5 min 10.000 rpm, 4° C) wurde die obere Phase abgenommen und nach Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion (s. Abschnitt 3.1.4) und Zugabe von 30 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 mit 1 ml Ethanol 30 min auf Eis gefällt.

#### **3.1.11. DNase-Verdau**

Nach der Ethanol-fällung wurde die RNA 15 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, in 70% Ethanol gewaschen, das getrocknete Pellet in 50 µl Wasser aufgenommen und mit 50 µl 2x DNase-Puffer versetzt. Dann wurde ein Mix aus 1,5 µl 2x DNase Puffer, 1 µl 0,5M DTT, 0,5 µl RNAsin (40 U/µl) und 1 µl RQ DNase (1 U/µl) dazu pipettiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit Wasser auf 250 µl aufgefüllt und die RNA erneut durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt.

#### **3.1.12. cDNA-Synthese durch reverse Transkription**

Es wurde je 1 µg RNA für die Synthese der cDNA eingesetzt. Die RNA wurde mit der entsprechenden Menge Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 3 min bei 70 °C denaturiert. Pro Ansatz wurden 4 µl 5x Puffer, 1 µl dNTPs, 1 µl Oligo dT (100 ng/µl), 1 µl reverse Transkriptase (200 U/µl) und 1 ml RNAsin (40 U/µl) mit 2 µl Wasser gemischt und je 10 µl dazu pipettiert. Die Reaktion erfolgte für 45 min bei 42 °C. Anschließend wurde die reverse Transkriptase 15 min bei 70 °C inaktiviert und das Volumen mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt.

#### 3.1.13. RT-PCR

Zur Amplifikation der gewünschten Sequenzen wurde die cDNA als Templat für eine analytische PCR eingesetzt. Anhand der Menge des amplifizierten DNA-Stücks kann man auf die Höhe der Expression der mRNA des entsprechenden Gens schließen.

Es wurden eingesetzt:

- 10  $\mu$ l 5x Puffer
- 5  $\mu$ l Templat
- 1,25  $\mu$ l dNTPs (je 10 mM)
- 1  $\mu$ l Primermix (je 10 pmol/ $\mu$ l)
- 32,25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 0,5  $\mu$ l Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
- 50  $\mu$ l Endvolumen

PCR-Bedingungen:

„Annealing“-Temperatur in Abhängigkeit von der Sequenz der Primer wählen.

95 °C 1min

55 °C 1min

72 °C 1min 30 s

28 - 35 Zyklen

Die RT-PCR wurde zum Nachweis der Expression von HA-CXCR4 in stabil transfizierten Zellen mit dem Primerpaar pTRE-HA-CXCR4 angewendet. Außerdem wurde die Expression von DGK mit den DGK-Primern analysiert und zur Kontrolle jeweils cDNA mit den GAPDH-Primern amplifiziert.

## 3.2. Methoden zur Analyse von Proteinen

### 3.2.1. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) trennt Proteine unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt nach ihrem Molekulargewicht auf. Die am weitesten verbreitete Methode stammt von Laemmli (Laemmli, 1970).

Probenvorbereitung:

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen geerntet und in 2x Probenpuffer lysiert. Um die DNA zu scheren und damit die Viskosität zu verringern wurde die Probe 2 min im Diagenode Bioruptor auf höchster Stufe sonifiziert. Zur Denaturierung der Proteine wurde die Probe 5 min bei 95 °C gekocht.

SDS-Gel:

Das SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel (große Poren, niedrige Salzkonzentration, niedriger pH-Wert), in dem die Proteinbanden fokussiert werden, und einem Trenngel (kleine Poren, hohe Salzkonzentration, hoher pH-Wert), das die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt.

Zunächst wurden mit 70% Ethanol gereinigte Glasplatten mit Abstandshaltern zusammengesetzt und abgedichtet. Dann wurde das Trenngel zwischen die Platten gegossen und mit 70% Ethanol überschichtet. Die Zusammensetzung ist beispielhaft für ein 10%iges Gel angegeben. Je nach Größe der Proteine wurden auch 15%ige Gele verwendet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm eingesetzt, um Taschen im Gel zu bilden, in welche später die Proben geladen wurden.

Nach dem Einsetzen in eine Gelkammer, die mit Laemmli-Puffer gefüllt wurde, wurde der Kamm gezogen und die Proben sowie ein Proteingrößenstandard aufgetragen. Der Lauf erfolgte für 1 h bei 120 V und weitere 2 h bei 180 V.

<u>Trenngel 10%</u>		<u>Sammelgel 5%</u>	
Acrylamid 30%	5 ml	Acrylamid 30%	1,7 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	3,75 ml	Tris 1 M pH 6,8	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	6 ml	H <sub>2</sub> O	6,75 ml
20% SDS	75 µl	20% SDS	50 µl
10% APS	150 µl	10% APS	100 µl
TEMED	15 µl	TEMED	10 µl

### 3.2.2. Coomassie-Färbung

Das Gel wurde zunächst 60 min bei RT in Fixierungslösung vorsichtig geschüttelt, um die Proteine im Polyacrylamidgel zu präzipitieren. Danach wurde die Fixierungslösung durch Coomassie-Blau-Färbelösung ersetzt und das Gel so lange geschüttelt, bis die Banden die gewünschte Intensität hatten. Zur Entfärbung wurde das Gel in 10% Essigsäure geschüttelt. Dabei wird lediglich der Hintergrund entfärbt, die Proteinbanden bleiben blau. Sobald die gewünschte Farbintensität erreicht war, wurde das Gel in 7% Essigsäure eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

### 3.2.3. Western Blot

Bei einem Western Blot werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, die durch das SDS negativ geladen sind, auf eine immobilisierende PVDF-Membran transferiert, die positive Ladungen trägt. Der Transfer erfolgt im elektrischen Feld durch Anlegen einer Spannung.

Es wurde die halbtrockene Methode mit dem „semidry-blotter“ verwendet. Auf die Anode wurden 3 Lagen Filterpapier gelegt, das zuvor mit Transferpuffer angefeuchtet worden war. Darauf wurde die mit Methanol angefeuchtete Membran gelegt. Das Gel wurde aus der Gekassette gelöst, zurechtgeschnitten, mit Transferpuffer benetzt und auf die Membran gelegt. Es folgten 3 weitere Lagen angefeuchtetes Filterpapier. Der Transfer erfolgte 1 h bei 20 V.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran 1 h bei RT mit 5% BSA in TBS geblockt und anschließend für 1-3 h mit dem Primärantikörper (s. Tabelle 2.6) in 5% BSA in TBS-Tween inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min mit TBS-Tween gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 30 min bei RT im Dunkeln mit Infrarotfarbstoff gekoppeltem Sekundärantikörper (s. Tabelle 2.6) in 5% BSA in TBS-Tween behandelt. Nach dem Waschen der Membran erfolgte die Detektion mit Hilfe des Odyssey Infrared Imagers der Firma Li-cor. Da das Gerät 2 separate Kanäle (700 nm und 800 nm) besitzt, sind Doppelfärbungen möglich.

Soll die Membran mit einem weiteren Antikörper behandelt werden, ist das Ablösen des zuerst verwendeten Antikörpers durch Denaturieren möglich. Dazu wird die Membran 40 min bei 50 °C in „stripping“-Lösung geschüttelt. Danach kann die

Membran erneut geblockt und wie oben beschrieben mit Antikörpern behandelt werden.

#### **3.2.4. Detektion von Oberflächenproteinen im Durchflusszytometer**

Im einem FACScan Durchflusszytometer wurden isolierte primäre humane T-Zellen auf ihre Reinheit überprüft, indem der TCR mit FITC-konjugiertem anti-CD3-Antikörper gefärbt wurde. Jurkat-Tet-On-Klone und primäre humane T-Zellen wurden auf die Oberflächenexpression von HA-CXCR4 WT und Mutante nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte untersucht. Außerdem wurde die Internalisierung des Rezeptors nach Behandlung mit SDF-1 $\alpha$  verfolgt.

1 $\cdot$ 10<sup>6</sup> behandelte oder unbehandelte Zellen wurden zweimal in 300  $\mu$ l PBS gewaschen, in 50  $\mu$ l anti-HA-Alexa Fluor 488 oder FITC-konjugiertem anti-CD3-Antikörper (1:20 in PBS) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen entweder 10 min mit 3% Formaldehyd in PBS fixiert oder direkt am Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrolle wurden jeweils ungefärbte Zellen mitgeführt.

#### **3.2.5. Herstellung eines GST-Fusionsproteins**

*E.coli BL21* wurden mit einem pGEX-Vektor zur Expression von GST-Rhotekin-RBD transformiert (s. Abschnitt 3.3.1). Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin 6 h inkubiert und anschließend ü.N. in 100 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin kultiviert. Diese Vorkultur wurde in 1 l LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin pipettiert und 2 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mM IPTG zur Induktion der Transkription und damit der Proteinexpression von pGEX-Vektoren wurde die Bakterienkultur weitere 4 h bei RT geschüttelt. Zur Isolierung des GST-Fusionsproteins wurden die Bakterien 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und in 15 ml GTLB1 resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde die Suspension 20 min bei RT rotiert. Anschließend wurden 8 ml GTLB2 hinzugefügt und der Ansatz 20 min bei 4 °C rotiert. Das Lysat wurde zur Scherung der DNA kurz (4 x 10 s mit jeweils 10 s Pause) auf Eis mit Ultraschall behandelt. Die DNA sowie unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde in

ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die weitere Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte durch nicht kovalente selektive Bindung an Glutathion-Agarose. Dazu wurden 0,5 ml einer 50%igen Aufschwemmung von Glutathion-Agarose zum Lysat gegeben und ü.N. bei 4 °C rotiert. Dann wurde die Glutathion-Agarose viermal mit eiskaltem PBS-Waschpuffer gewaschen und mit PBS + 1 mM DTT auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. 5 µl dieser Suspension wurden für die Proteinanalyse und Konzentrationsbestimmung entfernt. Der Rest wurde nach Zugabe von 500 µl Glycerin aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Proteinanalyse wurden die 5 µl der Suspension mit 45 µl PBS + 1 mM DTT verdünnt, mit 50 µl 2x Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C gekocht. Von der Probe wurden verschiedene Mengen neben BSA-Standards auf einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und die Banden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Intensität der Banden der Proben mit der der BSA-Banden verglichen.

#### **3.2.6. Bestimmung der Rho-Aktivität (Rho-GTP-Affinitätspräzipitation)**

Aktive kleine GTPasen wie Rho A sind GTP-gebunden. Nur in dieser Form binden sie an ihre Effektormoleküle wie Rhotekin. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Bestimmung der Aktivität kleiner GTPasen zunutze. Die Bindedomäne eines jeweils spezifischen Effektorproteins wird als GST-Fusionsprotein exprimiert und an Glutathionagarose gekoppelt (s. Abschnitt 3.2.5). Mit Hilfe dieses Fusionsproteins kann man die aktive kleine GTPase aus dem Zelllysate präzipitieren.

$1 \cdot 10^7$  Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer 5 min auf Eis lysiert. Die DNA wurde durch mehrmaliges Ziehen durch eine 25G-Kanüle geschert. Das Lysat wurde 10 min bei 60.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µl für die Ladekontrolle abgenommen und mit 50 µl 2x Probenpuffer versetzt. 900 µl Überstand wurden zu 40 µg vorgelegtem an Glutathion gebundenem GST-Rhotekin-RBD gegeben, welches zuvor zweimal mit Lysepuffer gewaschen worden war, und 1 h bei 4 °C rotiert. Um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, wurde die Glutathion-Agarose viermal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers wurde die Glutathion-Agarose mit 20 ml 2x Probenpuffer gemischt und anschließend 5 min bei 95 °C gekocht, ebenso wie das vorbereitete Lysat für die Ladekontrolle. Die Proben wurden

mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 3.2.1) und Western Blot (s. Abschnitt 3.2.3) mit anti-Rho A-Antikörper analysiert.

### **3.3. Bakterien**

#### **3.3.1. Transformation elektrokompenter *E. coli***

Die elektrokompenten *E.coli* (z. B. TOP10, BL21) wurden auf Eis aufgetaut. 40 µl der Bakteriensuspension wurden mit 1 ng Plasmid-DNA gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 1 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte im E.coli Pulser (Biorad) bei 1,8 kV. Danach wurde der Bakterien-DNA-Mix sofort mit 1 ml SOC-Medium aus der Küvette pipettiert und 1h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

#### **3.3.2. Einfrieren transformierter Bakterien**

700 µl einer Übernachtskultur der transformierten Bakterien wurden mit 300 µl steril filtriertem 50 %igem Glycerin bei -80 °C eingefroren.

### **3.4. Eukaryotische Zellen**

#### **3.4.1. Kultur der humanen T-Lymphom-Zelllinie Jurkat**

Die Zellen wurden in 145 mm-Zellkulturschalen in 30 ml Medium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 85 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Ihr Zustand wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Dicht gewachsene Zellen wurden in ein 50 ml-Röhrchen überführt, 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und ein Teil der Zellen in frischem Medium ausplattiert.

#### **3.4.2. Bestimmung der Zellzahl**

Die Zahl der Zellen in einer Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 10 µl der Zellsuspension wurden in die Zählkammer pipettiert und 3-4 Quadrate ausgezählt. Die Zahl der Zellen in einem Quadrat muss mit 10<sup>4</sup> multipliziert werden, um die Anzahl der Zellen pro ml Suspension zu erhalten.



### **3.4.3. Einfrieren von Zellen**

Die Zellen von 4 dicht bewachsenen 145 mm-Schalen wurden geerntet, in 10 ml Einfriermedium aufgenommen und je 1 ml in Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden in eine Einfrierbox gestellt, die 2 Tage bei -80 °C gelagert wurde. Dabei wurden die Zellen langsam auf -80 °C gekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.4.4. Auftauen von Zellen**

Im Gegensatz zum Einfrieren erfolgt das Auftauen von Zellen schnell. Sie wurden bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml Medium gewaschen und in 10 ml Medium in einer 90 ml-Schale ausplattiert. Die Kultur erfolgte wie oben beschrieben.

### **3.4.5. Transfektion von Jurkat-Zellen durch Elektroporation**

Durch das Anlegen einer hohen elektrischen Spannung entsteht ein starkes elektrisches Feld in der Zellsuspension. Dadurch entstehen vorübergehend Löcher in der Zellmembran, durch welche Plasmid-DNA eindringen kann.

Pro Ansatz wurden  $1\text{-}3\cdot 10^7$  Zellen in 400  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen, mit 30  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden DNA gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einer Küvette (4 mm Elektrodenabstand) bei 960  $\mu\text{F}$  und 250 bzw. 280 V in einem Gene Pulser-Elektroporator. Bei 250 V starben weniger Zellen, bei 280 V war hingegen die Transfektionseffizienz größer. Die Spannung wurde je nach experimenteller Anforderung individuell gewählt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen mit etwas Medium aus der Küvette pipettiert und in 5 ml Medium pro  $1\cdot 10^7$  Zellen ausplattiert.

Diese Methode wurde zum Herstellen der HA-CXCR4 stabil exprimierenden Klone verwendet.

### **3.4.6. Transfektion von Jurkat-Zellen durch Lipofektion**

Lipofektions-Reagenzien bestehen aus positiv geladenen Lipiden, die mit der negativ geladenen DNA Komplexe bilden, welche die Zellmembran durchqueren können. Diese Transfektionsmethode wurde für Luziferase-Experimente verwendet.

Pro Ansatz wurden  $1\cdot 10^7$  Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in einer 8 cm-Platte kultiviert. Außerdem wurden 20  $\mu\text{g}$  DNA (4  $\mu\text{g}$  pCMV-Renilla + 24  $\mu\text{g}$  pNFAT-Luc) sowie 68  $\mu\text{l}$  JetPEI in separaten Reaktionsgefäßen mit 500  $\mu\text{l}$  steril

filtrierter 0,15 M NaCl verdünnt. Beide Lösungen wurden direkt vereinigt und 15-30 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde anschließend zu den Zellen pipettiert. Nach Inkubation für 24 h wurde das Medium gewechselt.

Diese Transfektionsmethode wurde für Luziferase-Assays verwendet.

#### **3.4.7. Herstellung Tetracyclin induzierbarer stabiler Klone von HA-CXCR4 WT und Mutante**

Mit einem Vektor transfizierte Zellen können die transfizierte DNA in das Genom integrieren. Diese Integration geschieht nur mit einer Rate in der Größenordnung von 1:1000. Eine Resistenz des Vektors gegen ein bestimmtes Antibiotikum geht dann ebenfalls auf die Zelle über. Daher kann man durch Zugabe dieses Antibiotikums ins Medium die Zellen mit stabiler Integration selektieren, die anderen Zellen sterben ab.

Jurkat-Tet-On Zellen enthalten bereits einen stabil integrierten Vektor, der den reversen Tetracyclin kontrollierten Transaktivator (rtTA) nur in Gegenwart von Tetracyclin (bzw. dem weniger toxischen Analogon Doxycyclin) exprimiert. Der rtTA bindet dann an das „Tetracyclin response element“ (TRE) des pTRE-Vektors, unter dessen Kontrolle das inklonierte Gen exprimiert wird.

Die kodierende Sequenz von CXCR4 wurde zusammen mit der Sequenz für eine HA-Markierung durch Ausschneiden aus pcDNA3-HA-CXCR4 mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI in den Vektor pTRE2-pur kloniert. Zur Generierung der Mutante wurde durch Mutagenese (s. Abschnitt 3.1.9) mit den Primern mutaCXCR4\_1000 ein Stoppkodon eingeführt.

Beide Konstrukte wurden durch Elektroporation (s. Abschnitt 3.4.5) in  $1 \cdot 10^7$  Jurkat-Tet-On Zellen transfiziert und in 5 ml Medium 24 h kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 5 ml Medium verdünnt und weitere 24 h kultiviert. Nun wurden die Zellen nochmals 1:10 verdünnt und je 100  $\mu$ l in 96-Loch-Platten aliquotiert. Die Selektion erfolgte mit 3  $\mu$ g/ml Puromycin. Nach mehreren Wochen wurden die gewachsenen Klone expandiert, analysiert und eingefroren bzw. für Experimente verwendet.

#### **3.4.8. Stimulieren der Zellen mit anti-CD3-/anti-CD28-/SDF-1 $\alpha$ -gekoppelten „beads“**

Zur Stimulierung des T-Zellrezeptors wurden mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper gekoppelte Polystyren-Mikrosphären („beads“) verwendet. Dazu wurden

$10^7$  „beads“ mit je 2,5  $\mu\text{g}$  anti-CD3 und anti-CD28 und/oder 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  in 1 ml PBS 1,5 h bei RT rotiert. Dann wurde 30 min bei RT mit 1% BSA in PBS geblockt und die „beads“ anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Zur Stimulation wurde 1 „bead“ pro Zelle eingesetzt. Für den Luziferase-Assay wurden die „beads“ in die Zellkulturschalen gegeben und gemischt. Für die Mikroskopieexperimente wurden die Zellen nach Zugabe der „beads“ 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um die „beads“ schnell mit den Zellen in Kontakt zu bringen. Anschließend wurden die Zellen sofort resuspendiert und in die Kammern auf dem Deckglas pipettiert.

## **3.5. Zellbiologische Methoden**

### **3.5.1. Messung der Proliferation durch BrdU-Inkorporation**

Proliferierende Zellen synthetisieren neue DNA, die durch Einbau des Pyrimidin-Analogons 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) markiert wird. Zur Detektion der markierten DNA werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper behandelt, der BrdU erkennt und der an Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Durch Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) erfolgt eine Farbreaktion, welche in einem Spektrophotometer gemessen werden kann. Dabei ist die Farbintensität und somit auch die Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge proportional zur Menge der neu synthetisierten DNA und damit auch zur Anzahl der proliferierenden Zellen.

Die Stimulierung der Jurkat-Zellen erfolgte durch Ausplattieren in die Vertiefungen einer mit anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten 96-Loch-Platte. Die Beschichtung der Platte erfolgte ü. N. bei 4 °C mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3- und 9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD28-Antikörper in PBS.

Die Messung der Proliferation erfolgte mit dem Cell Proliferation ELISA BrdU-Kit von Roche Diagnostics. Jeder Ansatz wurde in vierfacher Ausfertigung durchgeführt. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurden  $4 \cdot 10^4$  Jurkat-Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt, die zum Teil 24 h mit SDF-1 $\alpha$  vorbehandelt wurden. 24 h nach Induktion der Proliferation mit anti-CD3/anti-CD28 wurden die Zellen 2 h in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  BrdU kultiviert. Anschließend wurde die 96-Loch-Platte 10 min bei 300 g zentrifugiert, um die Suspensionszellen am Boden der Platte zu sammeln. Das Medium wurde abgeschüttelt und die Platte 1 h bei 60 °C getrocknet.

Dann wurden die Zellen 30 min bei RT mit FixDenat-Lösung behandelt. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit wurde 1,5 h bei RT mit anti-BrdU-POD inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung entfernt. Durch Zugabe der Substratlösung wurden die Zellen 5-30 min bei RT gefärbt. Bei ausreichender Blaufärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Absorption bei 450 nm innerhalb von 5 min gemessen. Die Durchführung erfolgte in Triplikaten für jede Bedingung. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte in MS Excel.

#### **3.5.2. Apoptose-Test**

Apoptotische Zellen wurden mit Hilfe einer Annexin V/Propidiumiodid-Doppelfärbung detektiert. Dazu wurde der Annexin V Apoptosis Detection Kit der Firma Santa Cruz verwendet, wobei der mitgelieferte Puffer durch einen selbst angesetzten Calciumbindungspuffer ersetzt wurde. Apoptotische Zellen verlieren ihre Membranpolarität, wodurch das Membranlipid Phosphatidylserin externalisiert wird und somit auf der Zelloberfläche detektiert werden kann. Die Detektion erfolgt durch Bindung von FITC-gekoppeltem Annexin V. Dieses färbt jedoch auch nekrotische Zellen, da diese keine intakte Zellmembran mehr besitzen. Daher werden die nekrotischen Zellen zusätzlich durch den DNA-Farbstoff Propidiumiodid angefärbt, der nur die perforierte Zellmembran durchdringen kann. Vitale Zellen werden durch keines der beiden Reagenzien gefärbt.

1·10<sup>6</sup> Zellen wurden durch Zentrifugation bei 300 g für 3 min geerntet, mit 1 ml PBS ohne Ca/Mg gewaschen, in 400 µl Calciumbindungspuffer aufgenommen und auf 4 Ansätze mit je 100 µl aufgeteilt.

Zu den Ansätzen wurden

–

5 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) (färbt die nekrotischen Zellen)

2 µl Annexin V (0,2 µg/ml) (färbt die apoptotischen Zellen)

5 µl Propidiumiodid + 2 µl Annexin V

pipettiert und die Ansätze vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis im Dunkeln wurde die Färbung durch Zugabe von 600 µl PBS ohne Ca/Mg gestoppt. Die Zellen wurden sofort im Durchflusszytometer analysiert. Die Einstellung der Messparameter erfolgte mit Hilfe der einfach gefärbten Proben.

#### 3.5.3. IL-2-ELISA

Um die IL-2-Produktion der Zellen nach TCR-Stimulierung zu bestimmen, wurde der OptEIA IL-2 ELISA Kit von BD verwendet.

Dazu wurden je  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ml Hungermedium mit 0,25 % FCS ausgesät und zum Teil 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  behandelt. Dann wurden die T-Zellen für 18 h mit einem Antikörpermix aus Maus-anti-CD3/CD28 (je 1  $\mu$ g/ml) und Ziege-anti-Maus (5  $\mu$ g/ml) behandelt. Evt. wurden die Zellen 30 min davor in zwei Portionen aufgeteilt und mit 2  $\mu$ mol/l DGK I vorbehandelt. Die Zellen wurden zentrifugiert und die Überstände für den IL-2-ELISA eingesetzt.

Dazu wurde eine 96-Loch-ELISA-Platte über Nacht mit einem anti-IL-2-Antikörper beschichtet, dreimal mit 0,05 % Tween in PBS gewaschen und 1 h mit 10 % FCS in PBS geblockt. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100  $\mu$ l Zellüberstand in jede Vertiefung pipettiert. Zusätzlich wurde eine Eichreihe aus IL-2-Standards verwendet. Nach 2 h Inkubation wurde fünfmal gewaschen und mit einer Mischung aus einem Biotin markierten weiteren anti-IL-2-Antikörper und Streptavidin-HRP zur Markierung des gebundenen IL-2 für 1 h inkubiert. Die Detektion erfolgte entsprechend dem Proliferations-Assay mit TMB, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zum Stoppen der Reaktion, anschließend wurde mit dem ELISA-Reader die Farbintensität gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit MS Excel.

#### 3.5.4. Chemotaxis-Test

Chemotaxis bezeichnet die gerichtete Migration von Zellen entlang eines Gradienten einer chemotaktischen Substanz, in diesem Fall SDF-1 $\alpha$ .

Im Experiment werden sogenannte Transwell-Kammern verwendet, die aus einer oberen und einer unteren Kammer bestehen, welche durch eine Membran definierter Porengröße getrennt sind (in diesem Fall 6  $\mu$ m). Die Zellsuspension wird in die obere Kammer gegeben, die untere Kammer enthält Medium ohne oder mit chemotaktischer Substanz, um den Gradient auszubilden.

Das Experiment wurde in Duplikaten ausgeführt.  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Ansatz wurden 1 h in 100  $\mu$ l Medium ohne FCS gehungert und zum Teil am TCR stimuliert. Dazu wurden anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper 15 min bei RT mit Ziege-anti-Maus-Antikörpern quervernetzt und die Zellen weitere 15 min mit der Antikörpermischung behandelt. Die Endkonzentrationen betragen jeweils 5  $\mu$ g/ml für die Antikörper gegen

CD3 und CD28 und 10 µg/ml für den Ziege-anti-Maus-Antikörper. 100 µl Zellsuspension wurde in die oberen Kammern pipettiert, die in die unteren Kammern eingesetzt wurden, welche 600 µl Medium mit 10 ng/ml SDF-1α enthielten. Die Zellen wurden 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend der Inhalt der unteren Kammern in Eppendorf-Gefäße überführt und die Zellen ausgezählt. Die zufällige Migration unter jeder Bedingung wurde durch Weglassen von SDF-1α in der unteren Vertiefung gemessen und abgezogen.

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte in MS Excel.

#### **3.5.5. Luziferase-Reporter-Test**

Um die Aktivität eines Transkriptionsfaktors (TF) zu bestimmen, transfiziert man die Zellen mit einem Konstrukt, welches die kodierende Sequenz für Luziferase unter der Kontrolle eines durch den TF aktivierten Promotors enthält, und misst dann die Luziferaseaktivität in den Lysaten der verschiedenen behandelten Zellen.

Dafür wurden die Zellen durch Lipofektion (s. Abschnitt 3.4.6) mit pNFAT-Luc zur Bestimmung der Aktivität des TF NFAT und pCMV-Renilla zum Normalisieren der Transfektionseffizienz transfiziert. Nach 24 h wurden die Ansätze in je 24 ml Medium aufgenommen und in 24 Portionen in eine 24-Lochplatte gesät. Ein Teil der Zellen wurde 24 h mit 10 µg/ml des CXCR4-Antagonisten AMD3100 behandelt. Dann wurde ein Teil der Zellen 24 h mit 10 ng/ml SDF-1α induziert und schließlich bei einem Teil für 6 h der TCR mit „beads“ stimuliert (s. Abschnitt 3.4.8). Das Experiment wurde allen Bedingungen in Triplikaten ausgeführt. Die Zellen wurden in 50 µl Passive Lysis Buffer lysiert und je 20 µl für die Messung der Luziferase-Aktivität und der Renilla-Aktivität eingesetzt.

Die Messung erfolgte jeweils in weißen 96-Lochplatten. Zur Bestimmung der Renilla-Aktivität wurden 100 µl 5x Coelenterazin-Lösung injiziert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfordert die Injektion von 70 µl Assaypuffer mit ATP und 20 µl Luziferin-Assay-Lösung.

Die Auswertung erfolgte mit MS Excel.

#### **3.5.6. Calcium-Messung**

Fluo-4 ist ein Farbstoff, der bei Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen zum Fluoreszieren angeregt werden kann. Daher eignet er sich zur Messung von Calciumströmen nach Stimulation von Zellen. Dazu wird die Zelle mit dem Acetoxymethylester des

Farbstoffs beladen, der die Zellmembran durchqueren kann und in der Zelle verseift wird und so den Farbstoff freisetzt. Nach dem Laden wird dem Medium der Anionentransportinhibitor Sulfinpyrazon zugesetzt, um den Farbstoff in der Zelle zu halten. Die Messung der Fluoreszenz über die Zeit, welche die Änderung der Calciumkonzentration widerspiegelt, erfolgt am Durchflusszytometer.

Je Ansatz wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen in PBS ohne Ca/Mg gewaschen und in 1 ml 4  $\mu$ M Fluo-4-AM + 0,1% Pluronic F-127 in PBS aufgenommen. Nach 1 h Laden bei RT im Dunkeln wurde einmal mit 1 ml PBS + 1mM Sulfinpyrazon gewaschen und die Zellen in 1 ml auf 37 °C vorgewärmten Medium + 1mM Sulfinpyrazon aufgenommen.

Zum Aufnehmen des Basallevels wurde 30 s gemessen, dann wurden 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  zugegeben und 280 s lang aquiriert. Zum Schluss wurden 4  $\mu$ M Ionomycin zugegeben, um den Calcium-Einstrom aus dem Medium in die Zelle zu induzieren, und weitere 30 s gemessen. Die Calciumkonzentration in der Zelle entspricht dann der Konzentration im Medium. Daher wurde die mittlere Fluoreszenz nach der Zugabe von Ionomycin zum Normalisieren der Messwerte verwendet, um Unterschiede im Beladen mit Fluo-4 auszugleichen. Die Ermittlung der mittleren Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte mit dem Programm CellQuest. Für die Auswertung und Darstellung der Daten wurde MS Excel verwendet.

### **3.6. Mikroskopie**

Durch eine auf 37 °C beheizte mit CO<sub>2</sub> versorgte Kammer konnten lebende Zellen am Mikroskop beobachtet werden. Die Beobachtung erfolgte am konfokalen Mikroskop LSM 510 von Zeiss durch ein 63x Ölimmersionsobjektiv.

Jurkat-Zellen wurden durch Elektroporation (s. Abschnitt 3.4.5) mit CXCR4-GFP WT bzw. Mutante transfiziert und 24 h kultiviert.  $4 \cdot 10^4$  Zellen wurden nach Stimulierung mit „beads“ in 400  $\mu$ l Medium in die Kammern von 8-Kammerdeckgläsern pipettiert, und es wurde mindestens 1 h gewartet, bis die Zellen sich abgesetzt hatten. Dann wurden am Mikroskop beobachtet, ob sich stabile Paare aus „beads“ und Zellen gebildet hatten, und je Bedingung 50 Zellen aufgenommen. In jedem Bild wurde die Verteilung von GFP-CXCR4 evaluiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Herstellung eines Modells für das WHIM-Syndrom

Blutproben von WHIM-Syndrom Patienten, aus denen primäre T-Zellen isoliert werden könnten, sind nur schwer zugänglich und nur wenige Gruppen arbeiten damit. Eine Alternative zu primären Zellen von Patienten, welche die CXCR4-Mutation tragen, ist die Verwendung einer Zelllinie, welche stabil mit DNA transfiziert wurde, die für den mutierten CXCR4-Rezeptor kodiert. Dazu wurde durch Mutagenese in die CXCR4-kodierende Sequenz in einem Vektor für die Expression in Säugetierzellen ein Stoppkodon eingeführt, was zum Verlust der 19 letzten C-terminalen Aminosäuren führt. Diese Mutation wurde neben solchen, die zu Deletionen kürzerer Länge führen, in Trägern des WHIM-Syndroms nachgewiesen (Hernandez, 2003, Abb. 4.1: R334X). In transienten Transfektionen der Expressionsplasmide für Wildtyp CXCR4 und CXCR4<sub>WHIM</sub> in die humane T-Zelllinie Jurkat war die Expression des CXCR4-Proteins auch bei grundsätzlich guten Transfektionseffizienzen nur schwach nachweisbar. Unter der Hypothese, dass die Expression von WT CXCR4 und CXCR4<sub>WHIM</sub> für die Zellen möglicherweise toxisch ist, wurde entschieden, ein induzierbares System zu verwenden, das Tet-On-System (s. Abschnitt 3.4.7). Dabei tragen die Zellen die kodierende Sequenz für den reversen Tetracyclin kontrollierten Transaktivator (rtTA), dessen Expression durch Tetracyclin (bzw. dem weniger toxischen Analogon Doxycyclin) induziert wird. Der rtTA bindet dann an das „Tetracyclin response element“ (TRE) des pTRE-Vektors, unter dessen Kontrolle das einklonierte Gen, in diesem Fall CXCR4 exprimiert wird. Daher wurde die für

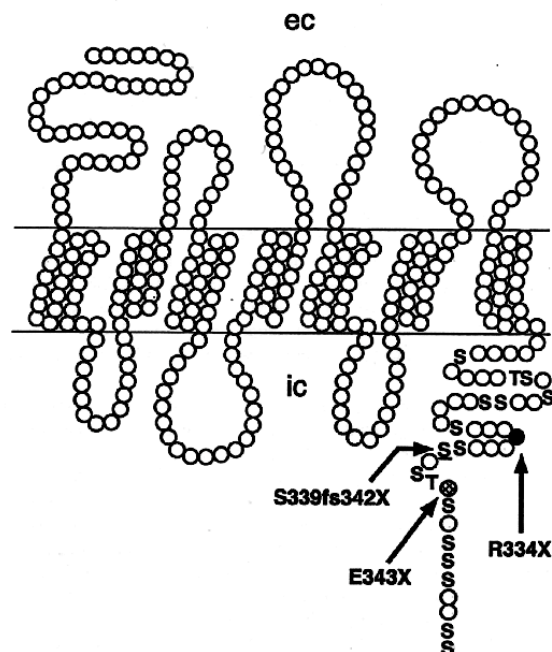


Abb. 4.1: CXCR4 mit in Trägern des WHIM-Syndroms gefundenen Mutationen



Wildtyp (WT) CXCR4 kodierende Sequenz in den pTRE-Vektor kloniert und die Mutation eingeführt. In 5'-Position zu CXCR4 war noch eine kurze Sequenz aus dem Hämagglutinin-Gen (HA) integriert, welche folglich am N-Terminus des Rezeptors als Markierungspeptid exprimiert wird und somit den Nachweis der Expression durch Unterscheidung vom endogenen Rezeptor mit spezifischen Antikörpern erlaubt. Als Zelllinie wurden Jurkat-Zellen verwendet, eine häufig gebrauchte, gut beschriebene humane T-Lymphomzelllinie. Jurkat-Zellen, die den rtTA stabil integriert tragen, sind kommerziell erhältlich. In diese wurde der pTRE-Vektor mit WT CXCR4 bzw. CXCR4<sub>WHIM</sub> transfiziert und stabile Klone selektiert und expandiert.

### 4.1.1. CXCR4-Expression

Die Expression von CXCR4 in stabil transfizierten Klonen wurde auf mRNA- und auf Proteinebene überprüft. Die Überprüfung erfolgte jeweils in uninduzierten Zellen und nach zweitägiger Behandlung mit 1 mg/l Doxycyclin (Dox) zur Induktion der Expression.

Zunächst wurde die Expression auf mRNA-Ebene überprüft. Dazu wurde totale mRNA aus Zellen isoliert, zu cDNA revers transkribiert und mit einem Primerpaar, von dem der Vorwärtsprimer spezifisch für die HA-Sequenz ist, eine RT-PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt entsprach der erwarteten Länge. Schon ohne Induktion mit Doxycyclin konnte mRNA in allen untersuchten Klonen detektiert werden (Abb. 4.2, A). Durch Behandlung mit Doxycyclin erhöhte sich die Expression von HA-CXCR4 in den Klonen 4G6, 3G9 und 10F10 deutlich.

Auf Proteinebene erfolgte die Überprüfung der Expression auf zweierlei Weise. Im Western Blot wurde die Expression durch einen Antikörper gegen die HA-Markierung nachgewiesen (Abb. 4.2, B). Die Positionen der Banden bei 42 kDa für den WT und 40 kDa für die Mutante stimmten mit der erwarteten Größe für HA-CXCR4 überein. Schon ohne Behandlung mit Doxycyclin wurde die Expression aller WT-Klone im Western Blot nachgewiesen. Lediglich Detektion der Expression des Klons 4G7 war im WB nicht möglich. In Übereinstimmung mit der Expression der mRNA zeigten die Klone 4G6, 3G9 und 10F10 eine Induzierbarkeit mit Doxycyclin. Mit einem Antikörper gegen CXCR4 selbst konnte die Expression nicht detektiert werden. Alle kommerziell erhältlichen Antikörper sind gegen ein Epitop der ersten 8 Aminosäuren von CXCR4 gerichtet, welches vermutlich durch das HA-Peptid verdeckt wird, wodurch ein Binden des Antikörpers sterisch behindert wird.

## 4. Ergebnisse

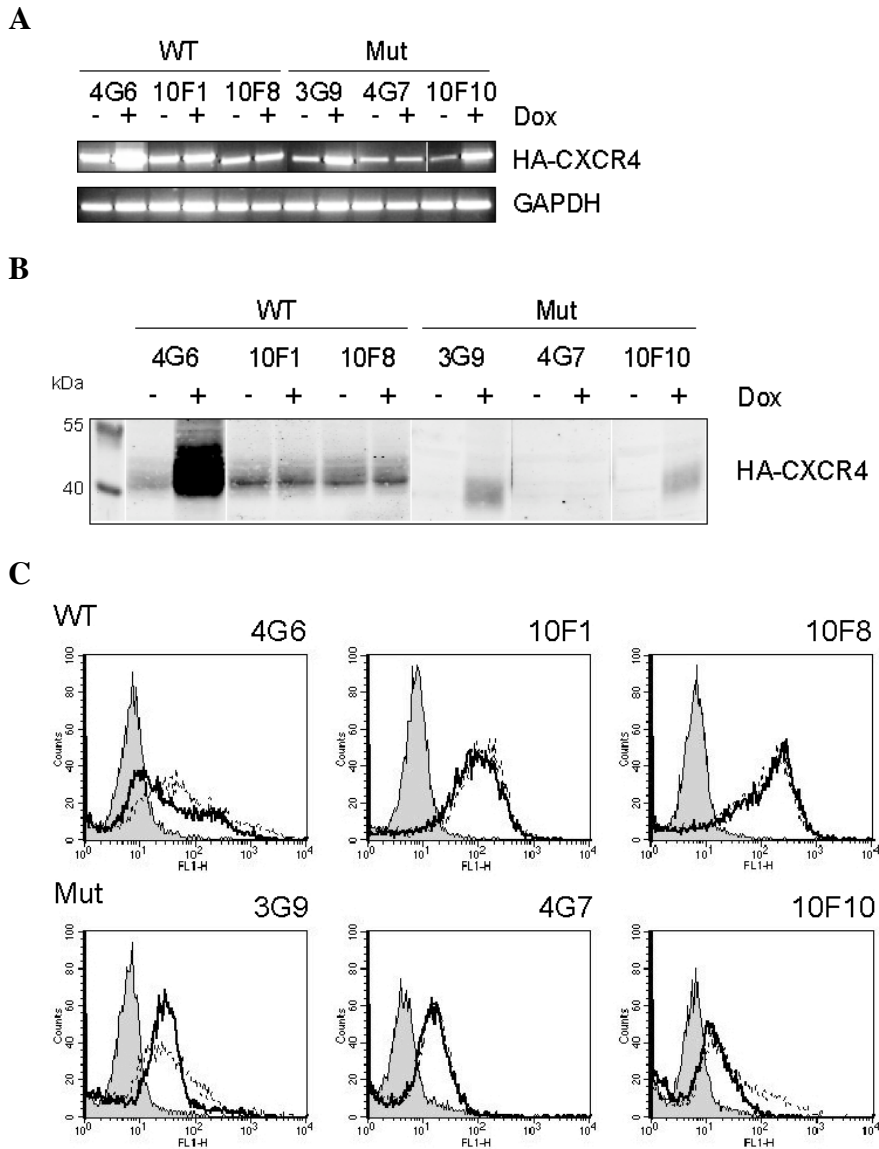


Abb. 4.2: Expression von HA-CXCR4 WT und Mutante (Mut) in stabilen Klonen der Zelllinie Tet-On Jurkat (Auswahl; die Bezeichnungen der Klone stammen von den 96-Lochplatten, in denen sie gezogen wurden), **A** RT-PCR mit HA spezifischen Primern, GAPDH als Ladekontrolle, **B** Protein im WB, Detektion mit anti-HA **C** Protein im FACS, gefärbt mit anti-HA Alexa Fluor 488 (grau, massiv: ungefärbt, Volllinie: - Dox, gestrichelte Linie: + Dox)

In einem zweiten Ansatz wurde die Expression von HA-CXCR4 an der Zelloberfläche nach Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem HA-Antikörper durch Durchflusszytometrie bestimmt. (Abb. 4.2 C). Die Färbung war spezifisch, da untransfizierte Zellen keine erhöhte Fluoreszenz zeigten. Im Vergleich zu ungefärbten Zellen (grau, massiv) zeigten alle Klone, auch der Klon 4G7, eine deutliche Verschiebung des Signals nach rechts, d. h. hin zu höherer Fluoreszenz. Die

Rechtsverschiebung entsprach der gefundenen Expression in RT-PCR und WB ohne (Volllinie) und mit (gestrichelte Linie) Doxycyclin.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch diesen Ansatz Zelllinien generiert wurden, die HA-CXCR4 WT respektive die WHIM-Syndrom-Mutante Doxycyclin induzierbar exprimieren, welche als Zellkulturmodell für die Untersuchung der Auswirkungen der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutation auf T-Zellen verwendet werden können.

### **4.2. Charakterisierung des T-Zell-Modells für das WHIM-Syndrom**

Zunächst musste das generierte Zellmodell validiert werden, d. h. es musste überprüft werden, ob die CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen sich genauso verhalten wie primäre T-Zellen aus WHIM-Syndrom-Patienten. Dazu wurden zwei Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse aus Experimenten mit primären Zellen von Patienten publiziert waren: Es wurden das Internalisierungsverhalten nach Ligandbindung sowie die SDF-1 $\alpha$  induzierte Calciumantwort untersucht.

In allen Experimenten wurden die Zellen, welche CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimieren, mit Zellen verglichen, welche mit WT CXCR4 transfiziert waren. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Effekte der transfizierten Mutante nur auf die Überexprimierung des Rezeptors zurückzuführen waren, sondern dass die Effekte im Gegensatz dazu wirklich aufgrund der Mutation selbst auftraten.

#### **4.2.1. Internalisierung**

Nach Bindung des Liganden SDF-1 $\alpha$  internalisiert der Rezeptor CXCR4 innerhalb kurzer Zeit. Aus der Literatur ist bekannt, dass der mutierte Rezeptor in primären T-Zellen eine deutlich verringerte Internalisierung aufweist (Balabanian *et al.*, 2005).

Zur Messung der Internalisierung wurde die Oberflächenexpression von HA-CXCR4 im Durchflusszytometer 15 und 30 min nach SDF-1 $\alpha$ -Zugabe mit der ohne SDF-1 $\alpha$ -Behandlung verglichen. Während die Oberflächenexpression von WT CXCR4 bereits nach 15 min schnell abnahm und sich nach 30 min kaum noch weiter verringerte, änderte sich die Oberflächenexpression von CXCR4<sub>WHIM</sub> nach SDF-1 $\alpha$ -Behandlung kaum (Abb. 4.3).

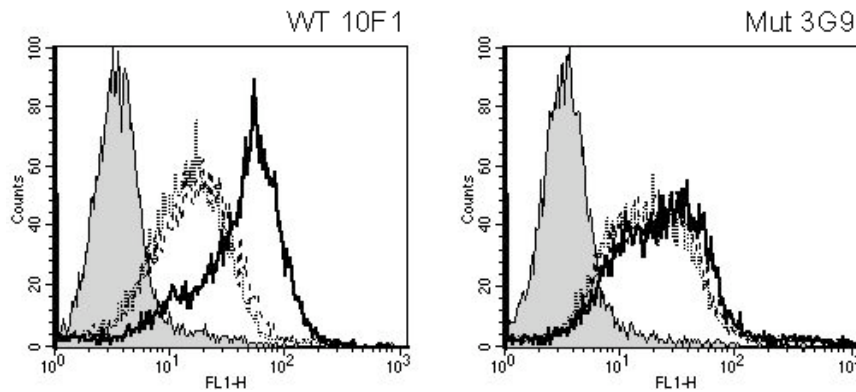


Abb. 4.3: Internalisierung von HA-CXCR4 nach Ligandbindung, Färbung mit anti-HA Alexa Fluor 488 (grau, massiv: -, ungefärbt, Volllinie: -, gestrichelte Linie: 15 min SDF-1 $\alpha$ , gepunktete Linie: 30 min SDF-1 $\alpha$ )

#### 4.2.2. Calcium-Einstrom

Die Konsequenzen der WHIM-Mutation im Rezeptor CXCR4 für den Calcium-Einstrom nach Stimulierung mit SDF-1 $\alpha$  sind in der Literatur uneinheitlich beschrieben. Während Gulino (2004) zu dem Ergebnis kam, dass T-Zellen aus WHIM-Syndrom-Patienten keine verstärkte Calcium-Antwort zeigen (bei 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ , entspricht 11,2 nM), wurde eine dreimal so hohe und länger anhaltende Calcium-Antwort in Lymphoblastoidzellen (bei 10 nM SDF-1 $\alpha$ ) (Hernandez *et al.*, 2003) nachgewiesen. Ein ähnliches Ergebnis wurde in mit CXCR4<sub>WHIM</sub> transfizierten humanen Stammzellen (1,4 mal so hoch bei 10 nM SDF-1 $\alpha$ ) bzw. der hämatopoetischen Zelllinie K562 (3,5 mal so hoch bei 200 nM SDF-1 $\alpha$ ) erhalten (Kawai *et al.*, 2005). In beiden letzteren Studien wurde auch ein erhöhter Basallevel von Calcium gefunden.

In dieser Arbeit wurde der Calcium-Einstrom durch Messung der Fluoreszenz mit dem Calcium-Ionophor Fluo-4 beladener Zellen im Durchflusszytometer aufgezeichnet.

Beide, mit WT und Mutante transfizierte Zellen, zeigten einen steilen Anstieg des Calciumspiegels nach Zugabe von SDF-1 $\alpha$ . Nach Durchlaufen des Maximums nach 20 s sank die Calciumkonzentration langsam ab, bis sie nach 480 s fast auf den entsprechenden Basallevel zurückfiel (Abb. 4.4). Zwischen WT und Mutante konnten drei Unterschiede festgestellt werden: 1. Die basale Calciumkonzentration war in der Mutante gegenüber dem WT um 14 % erhöht. 2. Die Höhe der Calciumspitze relativ

zum jeweiligen Basallevel war 17 % größer. 3. Der Abstand vom Basallevel nach 280 s war in der Mutante noch um 34 % höher als im WT, d. h. die Calciumantwort klingt in der Mutante langsamer ab.

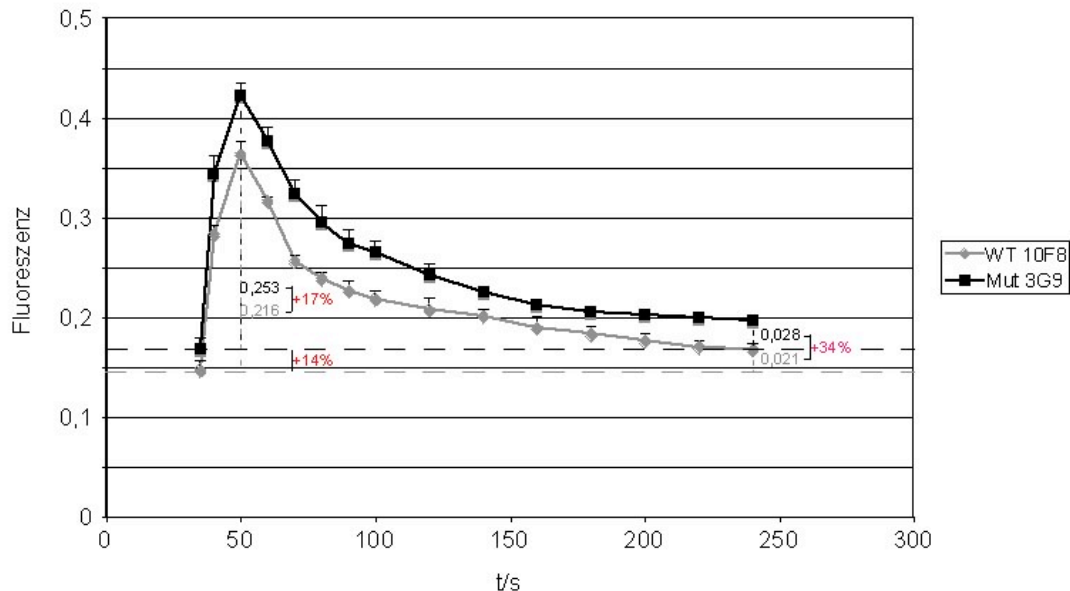


Abb. 4.4: Calcium-Einstrom nach Behandlung mit 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$

Damit konnten bereits veröffentlichte veränderte Eigenschaften der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante mit dem erstellten T-Zellmodell reproduziert werden. Die Mutante zeigt eine drastisch eingeschränkte Internalisierung nach Ligandbindung, einen leicht erhöhten basalen Calciumlevel sowie eine verstärkte und verlängerte Calciumantwort nach Stimulation mit SDF-1 $\alpha$ . D. h. die Zellen des Modells verhalten sich wie primäre T-Zellen aus Patienten. Somit ist das Modell zur weiteren Untersuchung der zellbiologischen Konsequenzen der Mutante geeignet.

### 4.3. Vergleich zellulärer Funktionen nach Aktivierung CXCR4<sub>WT</sub> und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierender T-Zellen

Zur Vermittlung der spezifischen Immunantwort müssen die T-Zellen durch Stimulierung des T-Zell-Rezeptors und eines costimulatorischen Moleküls, wie CD28, aktiviert werden. Es gibt eine Reihe von Parametern, anhand deren Bestimmung sich T-Zellaktivierung messen lässt. Durch Stimulation des T-Zellrezeptors erhalten die Zellen ein Stoppsignal, d. h. sie stoppen die Migration, eine wichtige Voraussetzung

für das Ausbilden einer stabilen IS. Nach mehrstündigem Aufrechterhalten der IS fangen die Zellen an, zu proliferieren, und leiten damit die klonale Expansion und Differenzierung ein, um eine Armee von T-Effektorzellen gegen das eingedrungene Pathogen zu generieren. Ein typisches Indiz der T-Zellaktivierung ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT, der die Transkription von IL-2 steuert. IL-2 induziert über einen autokrinen Mechanismus die Proliferation in der Phase der klonalen Expansion. Nach der Validierung des Zellmodells wurden diese Parameter daher in WT CXCR4 und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen verglichen, um herauszufinden, ob die Mutation von CXCR4 einen Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen hat.

### 4.3.1. Chemotaxis

Zur Messung der zellulären Antwort auf ein Stoppsignal hin wurde in einem sogenannten „transwell assay“ die Chemotaxis der Zellen durch eine poröse Membran hindurch aus SDF-1 $\alpha$ -freien Medium in Medium mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  induziert. Die T-Zellaktivierung wurde durch „clustern“ des TCR und Corezeptoren durch Vorbehandlung der Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern, welche durch Ziege-anti-Maus-Antikörper quervernetzt wurden, imitiert. Nach 3 h wurde die Chemotaxisrate bestimmt.

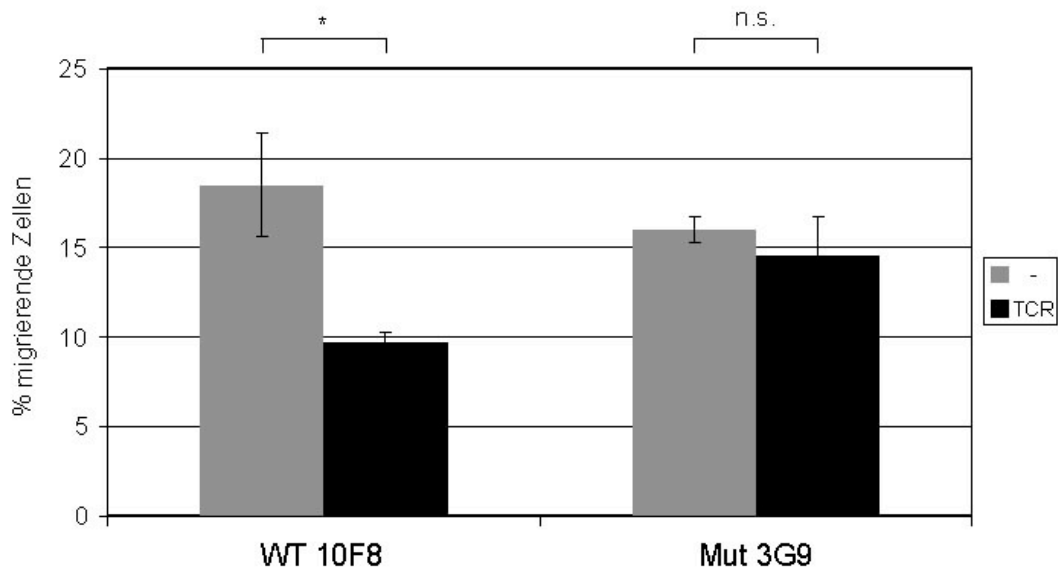


Abb. 4.5: Verringerung der Chemotaxis nach Erhalt des Stoppsignals durch T-Zellaktivierung mit anti-CD3/CD28 (1  $\mu\text{g/ml}$ ), quervernetzt mit Ziege-anti-Maus (5  $\mu\text{g/ml}$ ), Signifikanz berechnet mit t-Test, \*  $p < 0,05$ , n.s. nicht signifikant

Wie erwartet, zeigte sich in den WT-Zellen eine signifikante Reduktion der Chemotaxis, wenn die Zellen vorher mit Antikörpern stimuliert worden waren, d. h. Aktivierung des TCR und des Corezeptors CD28 führte zu einer Reduktion der Chemotaxis hin zu SDF-1 $\alpha$ . Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, welche CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierten, keine Reduktion der Chemotaxis nach Aktivierung (Abb. 4.5). D. h. die Mutante verhindert die Transmission des Stoppsignals und beeinträchtigt somit möglicherweise die Ausbildung einer stabilen, produktiven IS.

#### 4.3.2. Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT

Eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung spielt der TF NFAT (engl.: nuclear factor of activated T-cells), was sich in dessen Bezeichnung widerspiegelt. Seine Aktivierung ist u. a. Voraussetzung für die Produktion von IL-2 und die Vermittlung von Proliferation.

Die anti-CD3/anti-CD28-induzierte Aktivierung von NFAT in WT und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen wurde im Luziferase-Assay nach Transfektion eines NFAT abhängigen Firefly-Luziferase-Reporter-Konstrukts und Normalisierung im Vergleich zu einem cotransfizierten Renilla-Luziferase-Reporter gemessen.

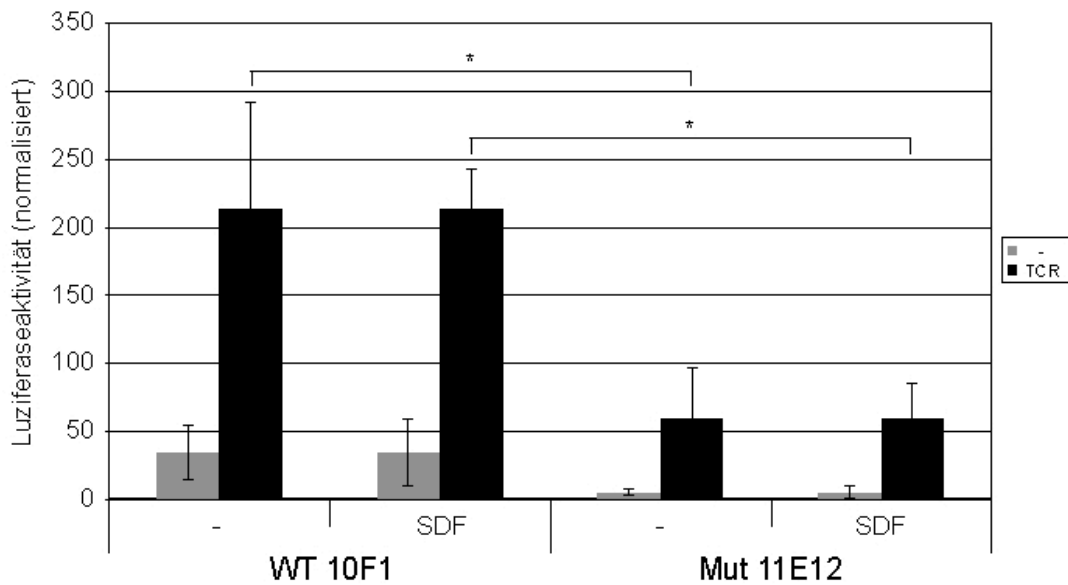


Abb. 4.6: Aktivierung des TF NFAT 6 h nach T-Zellstimulierung (TCR) mit anti-CD3/CD28-beschichteten „beads“, Vorbehandlung für 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  (SDF) in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Signifikanz berechnet mit t-Test, \*  $p < 0,05$

In den WT-Zellen zeigte sich eine deutliche Aktivierung von NFAT 6 h nach Stimulierung des TCR durch Quervernetzung mit Antikörpern. Im Vergleich dazu war die Aktivierung von NFAT in der Mutante um 80 % reduziert (Abb. 4.6). Auch die basale Aktivität von NFAT war in den Zellen, welche CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierten, um ca. 80 % verringert. Ein Einfluss von SDF-1 $\alpha$  konnte nicht detektiert werden.

#### 4.3.3. Produktion von Interleukin-2

Ein wichtiger Parameter der erfolgreichen Aktivierung von T-Zellen ist die Produktion von IL-2 zum Einleiten der klonalen Expansion. Die IL-2-Produktion 18 h nach Aktivierung durch Quervernetzung mit anti-CD3/anti-CD28/Ziege-anti-Maus-Antikörpern wurde zwischen CXCR4<sub>WHIM</sub> und WT CXCR4 exprimierenden Zellen durch Bestimmung der IL-2-Konzentration im Überstand der Zellen verglichen.



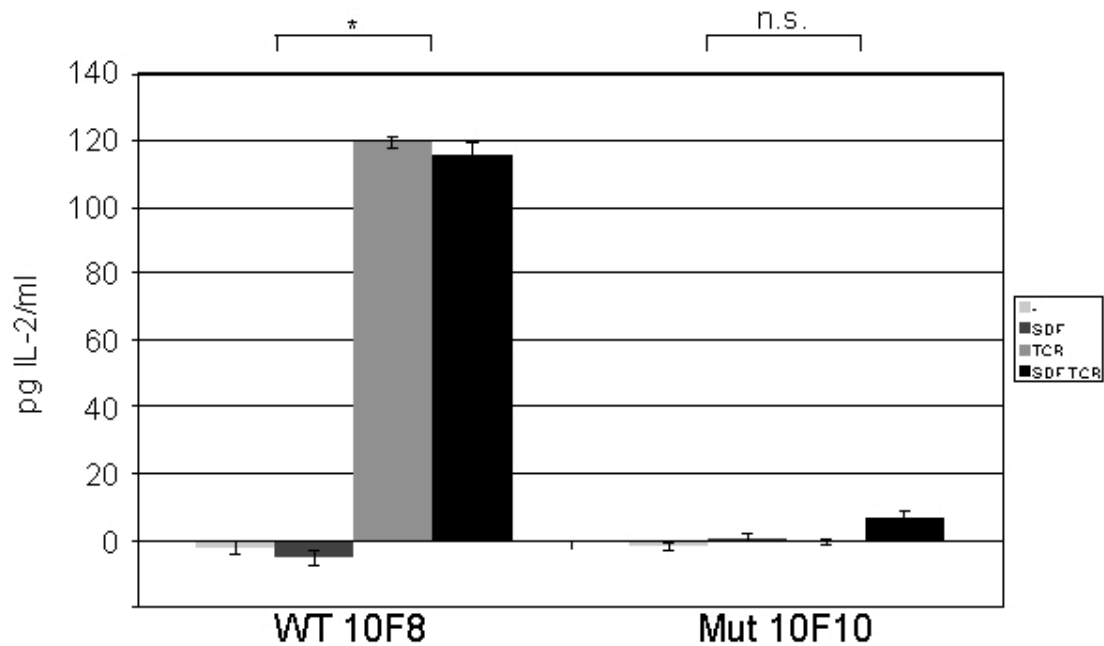


Abb. 4.7: IL-2-Produktion 18 h nach T-Zellstimulierung mit anti-CD3/CD28 (1  $\mu\text{g/ml}$ ), quervernetzt mit Ziege-anti-Maus (5  $\mu\text{g/ml}$ ), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Bestimmung der IL-2-Konzentration im Überstand durch IL-2-ELISA, Signifikanz berechnet mit t-Test, \*  $p < 0,05$ , n.s. nicht signifikant

Unstimulierte Zellen produzierten keine detektierbare Mengen an IL-2 (Abb. 4.7). TCR-Aktivierung führte zu IL-2-Konzentrationen von ca. 120 pg/ml im Überstand der WT-Zellen nach 18 h. Bei den CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen wurde hingegen keine messbare IL-2-Produktion induziert. Vorbehandlung mit SDF-1 $\alpha$  bewirkte keine signifikante Veränderung.

#### 4.3.4. Proliferation

IL-2 induziert die klonale Expansion durch Proliferation der aktivierten T-Zelle. Diese wurde in WT CXCR4 und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden T-Zellen 24 h nach T-Zellaktivierung durch anti-CD3/anti-CD28-Antikörper mittels BrdU-Inkorporation in die neu gebildete DNA gemessen.

Die Induktion der Proliferation nach T-Zellaktivierung in den stabil transfizierten Klonen wurde jeweils mit und ohne 24-stündige Vorbehandlung mit SDF-1 $\alpha$  gemessen.

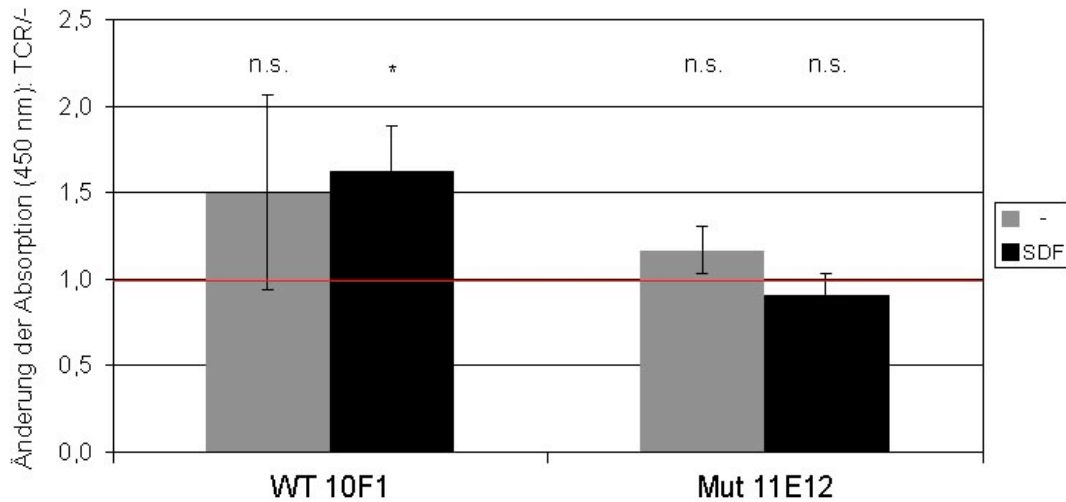


Abb. 4.8: Induktion der Proliferation 24 h nach T-Zellaktivierung durch Beschichtung der Platte mit anti-CD3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und anti-CD28 (9  $\mu\text{g/ml}$ ), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Signifikanz berechnet mit t-Test, \*  $p < 0,05$ , n.s. nicht signifikant

In den WT-Zellen ergab sich eine 1,5-fache Induktion der Proliferation 24 h nach TCR-Aktivierung, während T-Zellaktivierung in der Mutante keine weitere Proliferation induzieren konnte (Abb. 4.8). Eine Vorbehandlung mit SDF-1 $\alpha$  hatte dabei keinen signifikanten Einfluss. Die Induktion der Proliferation in den WT-Zellen fiel mit 1,5-fach dabei relativ klein aus. Dies liegt daran, dass Jurkat-T-Zellen schon eine recht hohe basale Proliferation zeigen.

#### 4.3.5. Apoptose

Dass in der Mutante keine erhöhte Proliferationsrate nach TCR-Aktivierung gefunden wurde, könnte theoretisch auch daran liegen, dass die Mutante eine verstärkte Apoptoserate aufweist, welche die erhöhte Proliferation ausgleicht. Daher wurde auch die Induktion von Apoptose in WT und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen unter den gleichen Bedingungen wie im vorherigen Proliferations-Experiment untersucht. Dabei wurde die Anzahl apoptotischer Zellen nach Färbung mit FITC-konjugiertem Annexin V im Durchflusszytometer bestimmt. Nekrotische Zellen wurden durch PI-Färbung ausgeschlossen.

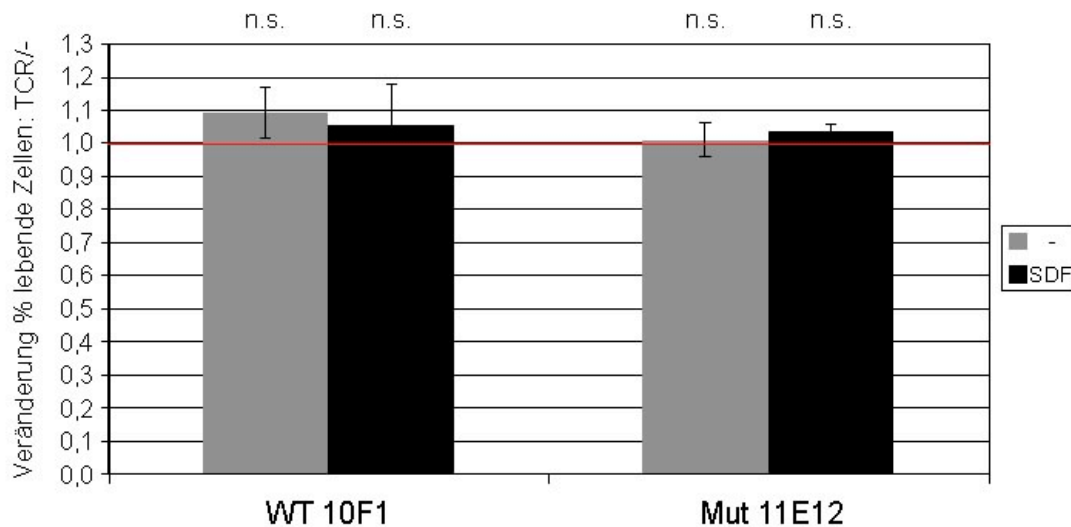


Abb. 4.9: Induktion von Apoptose nach T-Zellaktivierung, Bedingungen identisch Proliferations-Assay (s. Abb. 4.8), Signifikanz berechnet mit t-Test, \*  $p < 0,05$ , n.s. nicht signifikant

Es zeigte sich, dass weder im WT noch in der Mutante Apoptose durch TCR-Stimulierung und costimulatorisches Signal induziert wurde. Auch die Vorbehandlung der Zellen mit SDF-1 $\alpha$  hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate (Abb. 4.9). Somit kann gefolgert werden, dass die Werte für die Proliferation alle bei gleicher Apoptoserate der Zellen bestimmt worden waren und somit direkt verglichen werden können.

#### 4.4. Der CXCR4-Antagonist AMD3100 inhibiert den Effekt von CXCR4<sub>WHIM</sub> nicht

In CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen war bereits die basale Aktivität von NFAT herabgesetzt und somit war eine Vorbehandlung mit SDF-1 $\alpha$  keine Voraussetzung, um die inhibitorische Wirkung der Mutante auf IL-2-Produktion und Proliferation detektieren zu können. Möglicherweise ist die CXCR4-Mutante konstitutiv aktiv, oder sehr geringe Mengen an SDF-1 $\alpha$ , wie sie in dem im Medium enthaltenen fötalen Kälberserum vorhanden sind, reichen im Kontext der gestörten Deregulierung bereits aus, den mutierten Rezeptor im aktiven Zustand zu halten. Durch Verwendung eines SDF-1 $\alpha$ -Antagonisten sollte diese These überprüft werden. Es wurde untersucht, ob der SDF-1 $\alpha$ -Antagonist AMD3100 (Donzella *et al.*, 1998) die Aktivierung des TF

## 4. Ergebnisse

NFAT nach TCR-Stimulierung in der Mutante wiederherstellen kann. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit 10 µg/ml AMD3100 vorbehandelt. Dann wurde 24 h mit SDF-1α behandelt und der TCR 6 h mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern induziert.

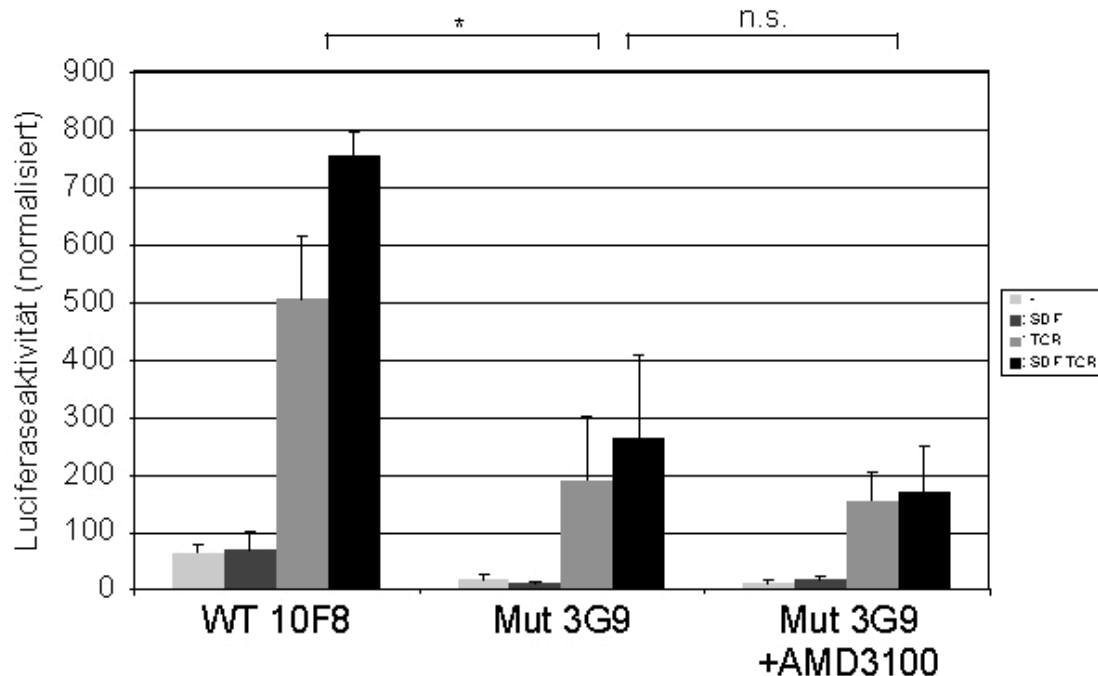


Abb. 4.10: Der CXCR4-Antagonist AMD3100 inhibiert nicht den Effekt der Mutante auf die Aktivierung von NFAT 6 h nach T-Zellstimulierung (TCR) mit anti-CD3/CD28-beschichteten „beads“, Vorbehandlung mit 10 µg/ml SDF-1α für 24 h

Es zeigte sich, dass der CXCR4-Antagonist keinen Einfluss auf die verringerte Aktivierung von NFAT nach TCR-Stimulierung in der Mutante im Vergleich zum WT hatte (Abb. 4.10), was die These untermauert. Vorbehandlung mit SDF-1α zeigte in diesem Fall eine leichte costimulatorische Wirkung wie in der Literatur beschrieben (Nanki and Lipsky, 2000, 2001). Um zu zeigen, dass der Antagonist funktioniert hat und über 24 h stabil war, wurden Zellen für 24 h, 1 h oder nicht mit AMD3100 behandelt und dann 5 min mit SDF-1α stimuliert. Dann wurde im WB überprüft, ob der Inhibitor einen Effekt auf die SDF-1α induzierte ERK-Phosphorylierung hat.

In der Tat wurde die SDF-1α induzierte ERK-Phosphorylierung 1 h und auch 24 h nach Zugabe des Antagonisten zu den Zellen sowohl im WT als auch der Mutante inhibiert (Abb. 4.11, vgl. Spuren 3 mit 4 und 5 bzw. 8 mit 9 und 10), d. h. der

Antagonist funktionierte in der verwendeten Konzentration und war auch über längere Zeit stabil.

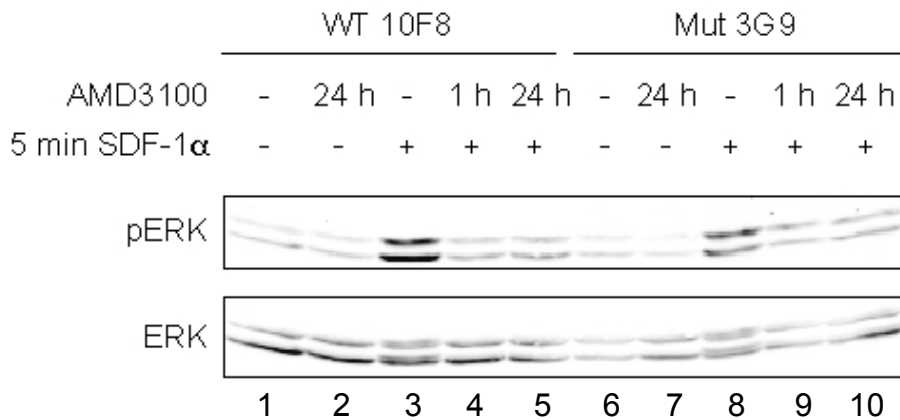


Abb. 4.11: Der CXCR4-Antagonist AMD3100 inhibiert SDF-1 $\alpha$  (10 ng/ml) induzierte ERK-Phosphorylierung und ist über 24 h stabil

#### 4.5. Einfluss der WHIM-Mutation auf Signaltransduktionsprozesse während der T-Zell-Aktivierung

Um die verminderte Aktivierung des TF NFAT, der IL-2-Produktion und der Proliferation nach T-Zell-Aktivierung in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen im Vergleich zu CXCR4<sub>WT</sub> Zellen zu erklären, wurden im folgenden Teil meiner Doktorarbeit die involvierten Signaltransduktionswege näher untersucht.

Aus vorherigen Arbeiten unseres Labors war bekannt, dass durch die Behandlung von vorstimulierten T-Zellen mit SDF-1 $\alpha$  über einen längeren Zeitraum die IL-2 induzierte Proliferation durch Inhibierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs vermindert wird. Bei direkter Aktivierung dieses Signalwegs mit TPA auf der Ebene von Ras wird das Signal zwischen Raf und MEK nicht

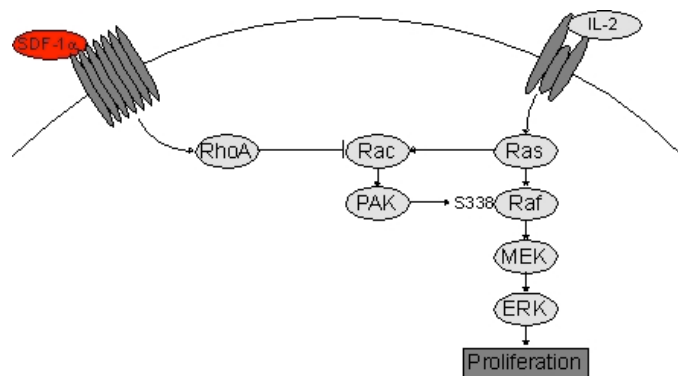


Abb. 4.12: Rho A vermittelte Inhibierung der Raf-Aktivierung durch den Rac-PAK-Signalweg

weitergeleitet. Diese Blockierung wird durch Rho A vermittelt, welches Rac inhibiert und damit eine für die Aktivierung essentielle Phosphorylierung von Ras an Serin 338 durch den Rac-Pak-Signalweg verhindert (Abb. 4.12, M. Cramer, submitted). Derselbe Mechanismus könnte auch dafür verantwortlich sein, dass Zellen, welche die WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante exprimieren, eine verminderte Proliferation nach TCR-Aktivierung zeigen. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst die Aktivierung des ERK-Signalwegs in WT CXCR4 und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

#### 4.5.1. Der ERK-Signalweg ist in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen inhibiert

##### 4.5.1.1. Nach Induktion mit TPA

Nach 24-stündiger Vorbehandlung mit SDF-1 $\alpha$  wurde der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg durch Stimulierung mit TPA aktiviert. Die Aktivität des Signalwegs wurde durch Westernblot mit phosphospezifischen Antikörpern gegen MEK und ERK evaluiert (Abb. 4. 13).

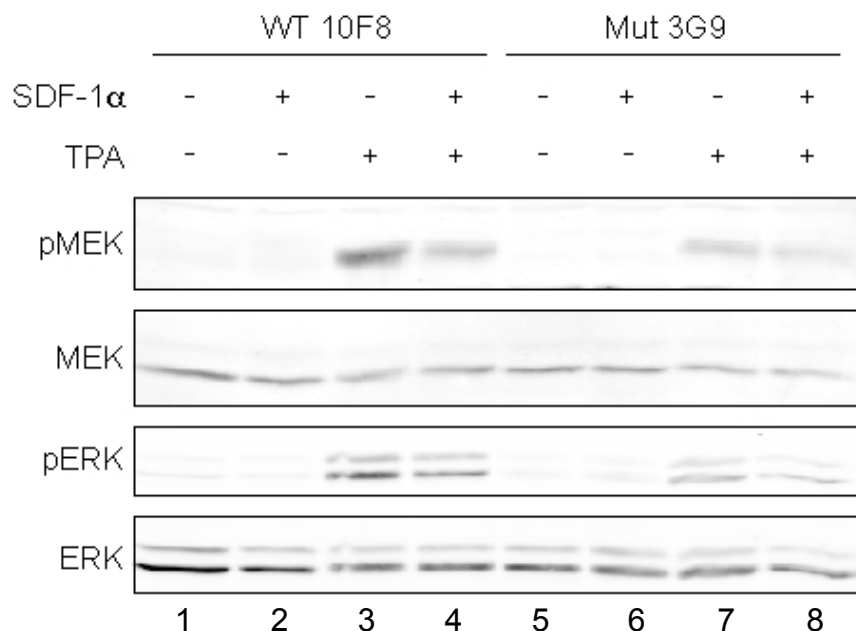


Abb. 4.13: Inhibierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs nach Induktion für 10 min mit 2 ng/ml TPA, Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS

In den WT-Zellen konnte der inhibierende Effekt von SDF-1 $\alpha$  auf die TPA induzierte Aktivierung des ERK-Signalwegs reproduziert werden. Die Phosphorylierung von MEK und ERK war bei Vorbehandlung mit SDF-1 $\alpha$  deutlich vermindert (vgl. Spuren 3 und 4). Die Mutante zeigte ein deutlich vermindertes Niveau an Phosphorylierung von MEK und ERK (vgl. Spuren 3 und 7), was durch Vorbehandlung mit SDF-1 $\alpha$  noch weiter verringert wurde (Spur 8).

### **4.5.1.2. Nach Aktivierung des T-Zellrezeptors**

SDF-1 $\alpha$  inhibiert zwar IL-2 induzierte Proliferation in T-Zellen, nicht jedoch durch Aktivierung des TCR induzierte Proliferation (M. Cramer, submitted), was dadurch erklärt werden kann, dass TCR-Aktivierung die Aktivität von Rho A herunterreguliert (eigene Beobachtungen, nicht veröffentlicht) und dadurch die Blockierung des ERK-Signalwegs aufhebt.

Es wurde daher die Frage gestellt, ob die verstärkte Aktivität des mutierten Rezeptors ausreicht, um dem entgegenzuwirken und die Inhibierung des ERK-Signalwegs aufrechtzuerhalten und damit auch die TCR induzierte Proliferation zu verhindern.

Dazu wurde dasselbe Experiment durchgeführt mit dem Unterschied, dass der ERK-Signalweg durch TCR-Stimulierung mit Antikörpern anstatt TPA aktiviert wurde.

Wie erwartet wurde in den WT-Zellen kein blockierender Effekt von SDF-1 $\alpha$  auf die Phosphorylierung von MEK und ERK beobachtet (Abb. 4.14: vgl. Spuren 3 und 4). Das Niveau der MEK- und ERK-Phosphorylierung in der Mutante fiel jedoch immer noch deutlich geringer aus als im WT (vgl. Spuren 3 und 7). SDF-1 $\alpha$  zeigte keinen weiteren verringenden Einfluss auf die Aktivierung des ERK-Signalwegs.

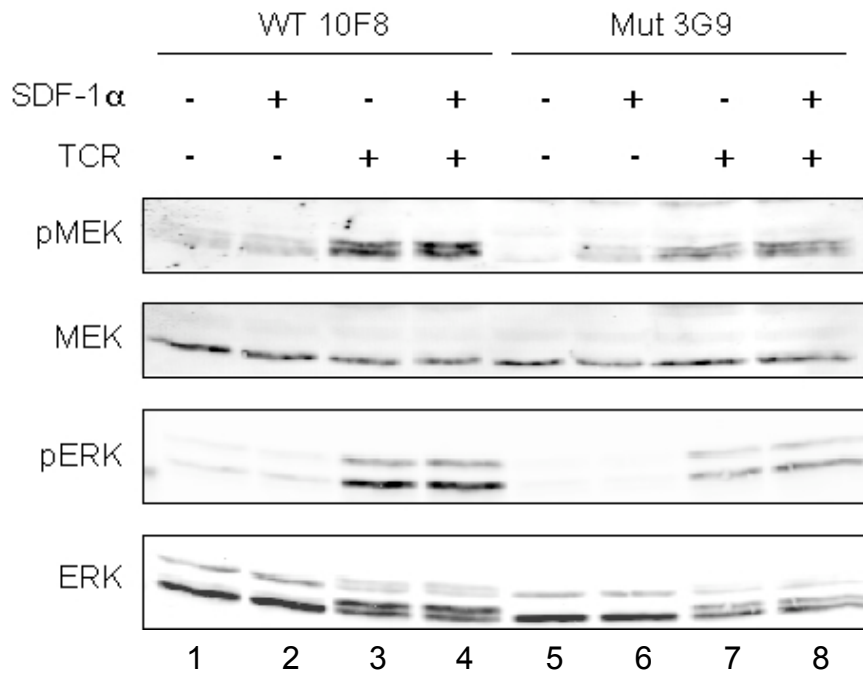


Abb. 4.14: Inhibierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs nach Aktivierung des TCR für 1 min durch Quervernetzung mit Antikörpern (s. Abb.4.7), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS

#### 4.5.2. Aktivität von Rho A in der Mutante

Sollte die Vermutung stimmen, dass die Inhibierung des ERK-Signalwegs in den CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen durch den uns bekannten Mechanismus über die Inhibierung des Rac-Pak-Signalwegs durch Rho A vermittelt würde, dann sollten diese Zellen eine höhere Rho A-Aktivität zeigen, welche durch die gestörte Deregulation und daraus resultierende basale Aktivität von CXCR4<sub>WHIM</sub> erklärt werden könnte. Auch sollte die in WT-Zellen beobachtete Dominanz der TCR-Aktivierung über SDF-1 $\alpha$  in Bezug auf die Aktivität von Rho A revertiert sein.

Um dies zu untersuchen, wurde die Aktivität von Rho A durch Rho-GTP-Affinitätspräzipitation unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Zur Überprüfung der TCR-Aktivierung wurde auch die Phosphorylierung von ERK beobachtet (Abb. 4.15).

In den WT-Zellen ergab sich dabei folgendes Muster: Behandlung mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  für 30 min führte zu einer Erhöhung der Rho A-Aktivität gegenüber unbehandelten Zellen (1, vgl. Spuren 1 und 2). T-Zell-Aktivierung mit Antikörpern (anti-CD3/CD28 je 1  $\mu$ g/ml, Ziege-anti-Maus 5  $\mu$ g/ml) für 10 min führte zu einem



Abfall der Rho A-Aktivität unter den Basallevel (**1**, vgl. Spuren 1 und 3). Dieser Effekt war dominant über die Aktivierung von Rho A durch SDF-1 $\alpha$  (nicht sehr deutlich sichtbar im gezeigten Exp., aber vgl. **2**, Spur 4). Im Vergleich von CXCR4<sub>WHIM</sub> mit dem WT ergab sich ein unerwartetes Bild: Die basale Aktivität von Rho A lag nicht höher als in den WT-Zellen, sondern war maximal gleichhoch (**1**, vgl. Spuren 1 und 5). Interessanterweise konnte auch keinerlei Regulierung der Rho A-Aktivität in den CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen, weder durch SDF-1 $\alpha$ , noch durch TCR-Aktivierung, festgestellt werden (**1**, Spuren 5 bis 8).

Dieses überraschende Ergebnis schloss die Möglichkeit aus, dass der uns bekannte SDF-1 $\alpha$  vermittelte Mechanismus der Inhibierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade Ursache für die gestörte Aktivierung der CXCR4<sub>WHIM</sub> transfizierten Zellen war.

## 4. Ergebnisse

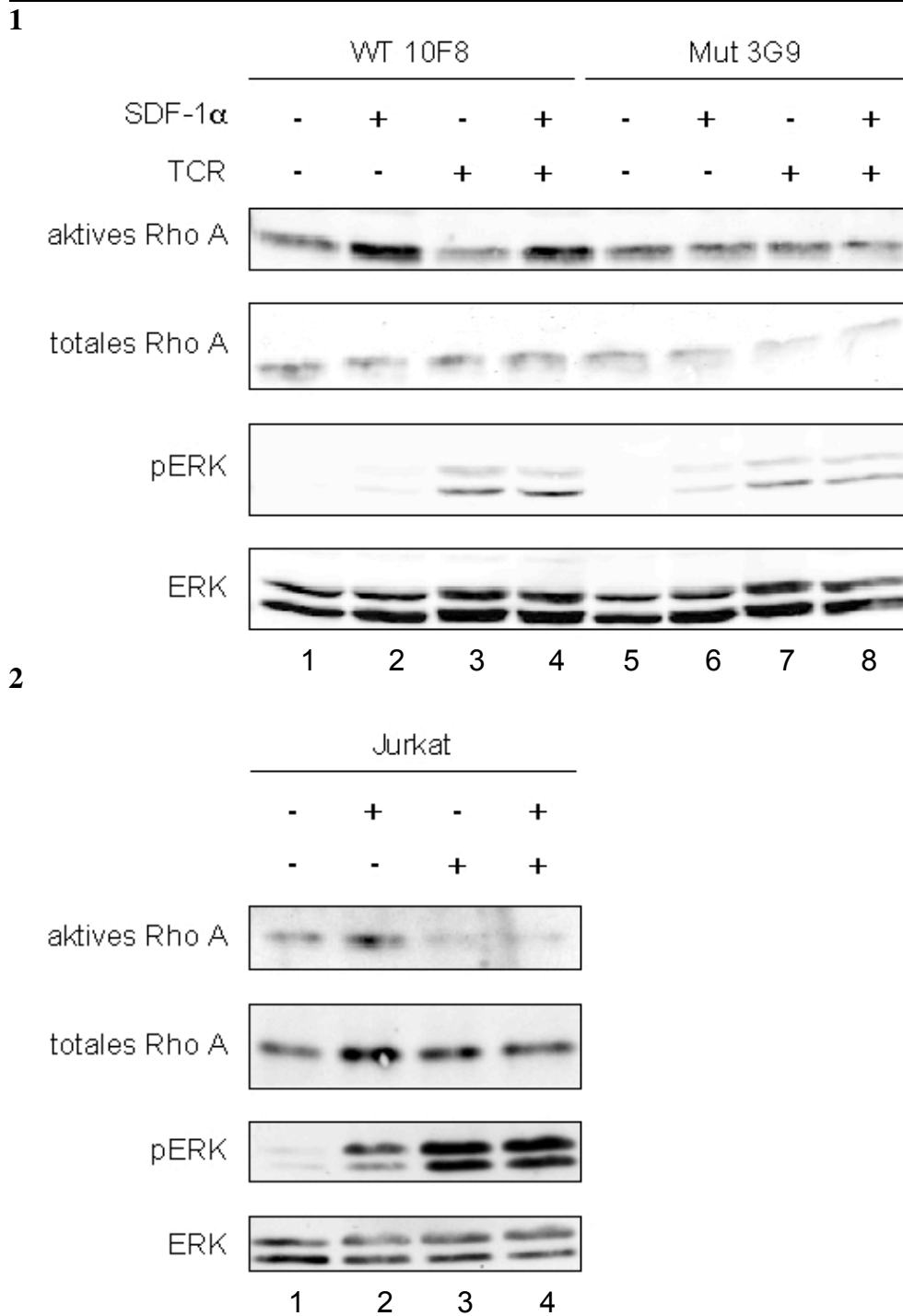


Abb. 4.15: Rho-GST-Affinitätspräzipitation, Inkubation der Zellen für 1 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS, Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  und/oder 10 min T-Zellstimulierung mit AK (s.o.)

### 4.5.3. Der Signalweg zwischen T-Zellrezeptor und Ras

Nun wurde auch die Signalkaskade zwischen dem TCR und Ras untersucht, um mögliche weitere Defekte weiter oben in der Signaltransduktion aufzudecken, welche die bereits beschriebenen Störungen nach sich ziehen könnten. Wichtige Moleküle in diesem Abschnitt sind Lck, ZAP-70 und LAT (s. Abschnitt 1.3.2).

Dazu wurde der Phosphorylierungsstatus der oben genannten Proteine unter denselben Bedingungen wie in Abb. 4.14 untersucht.

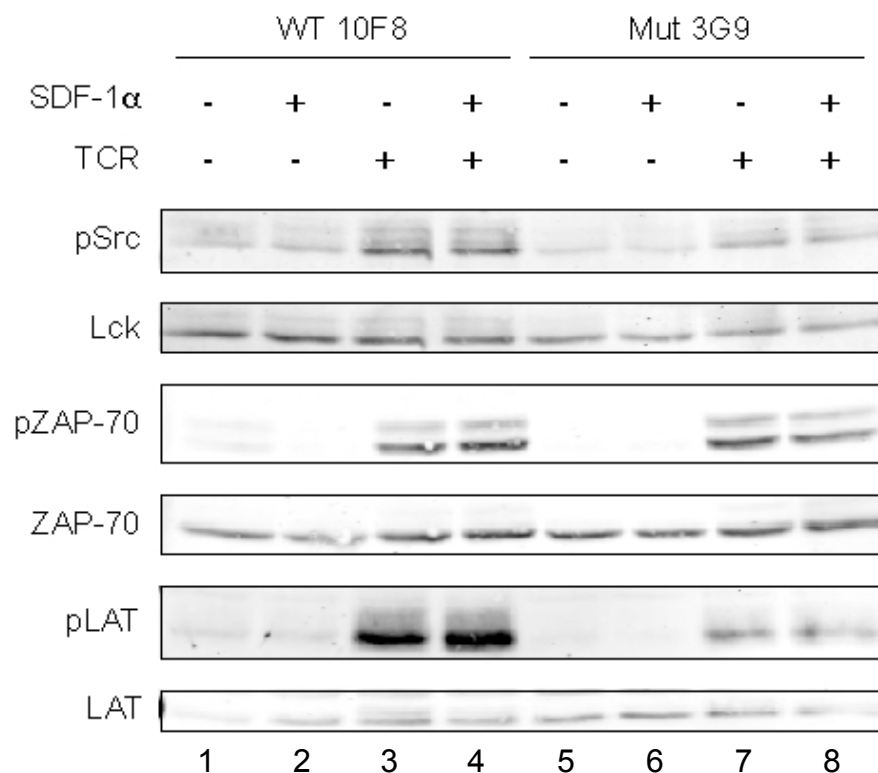


Abb. 4.16: Einfluss der Mutante auf Signalproteine zwischen TCR und Ras, T-Zellaktivierung für 1 min mit AK (s.o.), Vorbehandlung mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  für 24 h in Hungermedium mit 0,25 % FCS

Die Phosphorylierung von ZAP-70 nach TCR-Stimulierung unterschied sich nicht zwischen WT und Mutante (Fig. 4.16: vgl. Spuren 3 und 4 mit 7 und 8). Im WB mit Antikörper gegen phosphorylierte Proteine der Src-Familie zeigte sich eine leichte Abnahme in CXCR4<sub>WHIM</sub> verglichen mit WT CXCR4 transfizierten Zellen (nach Quantifizierung der Banden und Normalisierung gegen pan-Lck). Da Lck jedoch oberhalb von ZAP-70 in der Signalkaskade liegt, kommt die geringere Bandenstärke vermutlich durch geringere Phosphorylierung der anderen Mitglieder der Src-Familie

in der Mutante zustande. Eine deutlich geringere Phosphorylierung in der Mutante wurde für das Protein LAT gefunden (vgl. Spuren 3 und 4 mit 7 und 8).

Das ist ein weiteres Indiz dafür, dass nicht die Blockierung der Signaltransduktion durch Rho A für die gestörten Funktionen der Mutante verantwortlich ist, da sie erst auf der Höhe von Raf, also unterhalb von LAT, erfolgt. Es muss also einen anderen Mechanismus geben, der die Signaltransduktion nach TCR-Aktivierung in der Mutante inhibiert.

### **4.6. Mit der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante transfizierte Zellen weisen charakteristische Merkmale auf, die man auch in anergen T-Zellen findet**

Verringerte Proliferation und NFAT-Aktivierung sowie Inhibierung des Ras-Signalwegs sind typische Merkmale aneurer T-Zellen. Ähnlich wie in anergen T-Zellen ist in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden T-Zellen der basale Calciumspiegel erhöht. Dies führt in anergen T-Zellen zur Aktivierung eines Anergieprogramms, d. h. zur Veränderung der Signaltransduktion durch Transkription und Translation verschiedener Proteine (vgl. Abschnitt 1.3.4). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass in T-Zellen mit der WHIM-Mutante ebenfalls ein Anergieprogramm aktiv sein könnte. Kürzlich wurde von Zha et al. (2006) berichtet, dass Diacylglycerolkinasen in anergen Zellen hochreguliert sind und durch die Metabolisierung von Ras-aktivierendem DAG eine kausative Rolle in der Ausbildung von Anergie besitzen.

#### **4.6.1. Diacylglycerolkinase (DGK) ist in T-Zellen, welche die WHIM-Syndrom CXCR4-Mutante exprimieren, hochreguliert**

Daher wurde die Expression von DGK in T-Zellen, welche CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimieren, mit solchen, die den WT exprimieren verglichen. Hierzu wurde mRNA aus den Zellen isoliert und eine RT-PCR mit Primern durchgeführt, welche alle Isoformen der humanen DGK amplifizieren.

Schon die Überexpression von WT CXCR4 führte zu einer leichten Erhöhung der mRNA-Expression von DGK (Abb. 4.17, vgl. Spuren 1 und 2). In Zellen, welche wenig mutiertes CXCR4 exprimieren (mit der Mutante transfizierte Zellen ohne Doxycyclin-behandlung), wurde ein im Vergleich zum WT deutlich erhöhtes Niveau an DGK-mRNA gefunden (Spur 3). Überexpression der Mutante nach Induktion mit Doxycyclin erhöhte die Menge an DGK-mRNA noch weiter (Spur 4).

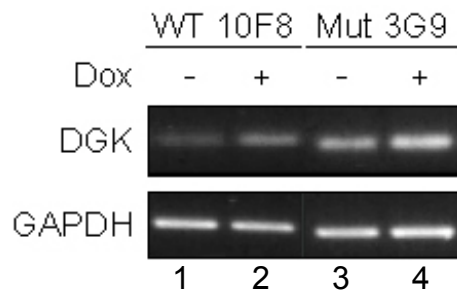


Abb. 4.17: mRNA-Expression von DGK, RT-PCR, 48 h Vorbehandlung mit Doxycyclin

Damit ergab sich ein weiteres typisches Merkmal für anerge T-Zellen und warf zugleich die Frage auf, ob die Erhöhung der DGK-Expression auch in diesem Fall ursächlich für die Anergie war.

#### 4.6.2. Inhibition von DGK stellt die Signaltransduktion wieder her

Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen vor der TCR-Aktivierung 30 min mit einem spezifischen DGK-Inhibitor behandelt (Zha 2006), um die erhöhte Aktivität von DGK zu reduzieren.

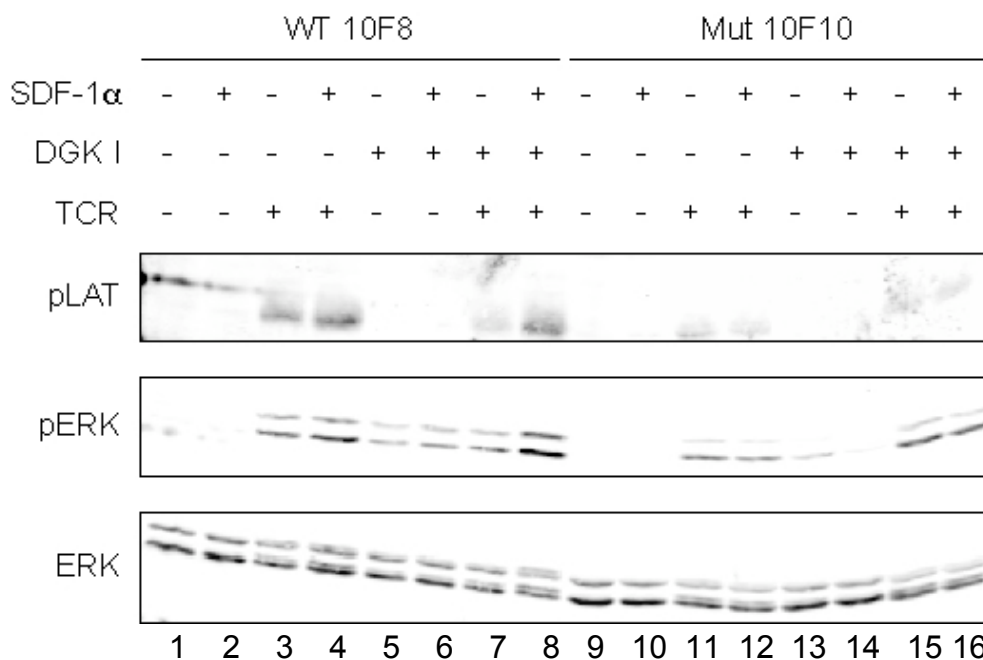


Abb. 4.18: Einfluss des DGK-Inhibitors auf die Signaltransduktion, 30 min Behandlung mit 10  $\mu$ mol/l DGK I, 1 min TCR-Aktivierung mit Antikörpern (s. Abb.4.16), Vorbehandlung für 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  in Hungermedium mit 0,25 % FCS

In WT CXCR4 exprimierenden Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und mit DGK I behandelten Zellen (Abb. 4.18, vgl. Spuren 3 und 4 mit 7 und 8). In CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen wurde die defekte Phosphorylierung von ERK nach TCR-Stimulierung auf ein dem WT vergleichbares Niveau zurück angehoben (vgl. Spuren 11 und 12 mit 15 und 16 bzw. 15 und 16 mit 3 und 4). Die Phosphorylierung von LAT blieb jedoch weiterhin defekt. Die Inhibierung der übermäßigen DGK-Aktivität in der Mutante überbrückt also nur die defekte Signaltransduktion und stellt nicht den Normalzustand wieder her.

#### 4.6.3. Überbrücken der Signaltransduktion durch DGK I stellt die IL-2-Produktion nach TCR-Stimulierung wieder her

Nun stellte sich die Frage, ob Wiederherstellen der Signaltransduktion von Ras abwärts ausreicht, um auch die T-Zellfunktion wiederherzustellen. Dies wurde am Beispiel der IL-2-Produktion nach TCR-Stimulierung untersucht.

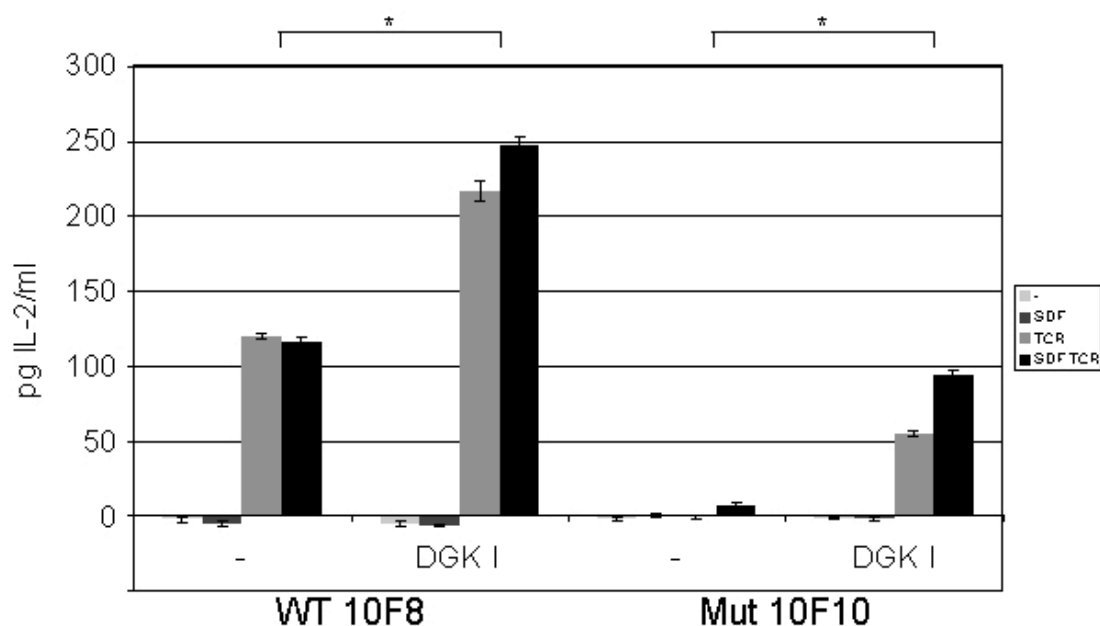


Abb. 4.19: Einfluss von DGK I auf TCR induzierte IL-2-Produktion, 30 min Behandlung mit 2  $\mu$ mol/l DGK I, 18 h T-Zellaktivierung mit AK (s. Abb.4.7), Vorbehandlung für 24 h mit 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  in Hungermedium mit 0,25 % FCS

In diesem Fall zeigte sich auch in WT CXCR4 exprimierenden Zellen eine deutliche Verstärkung der IL-2-Produktion auf etwa die doppelte Menge (Abb. 4.19). CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierende Zellen, welche kein IL-2 nach TCR-Stimulierung produzierten, zeigten eine signifikante IL-2-Sekretion von 55 bzw. 93 pg/ml ohne bzw. mit SDF-1 $\alpha$ -Vorbehandlung. Letzterer Wert entspricht 75 % des WT-Niveaus.

D. h. Inhibierung der in der Mutante verstärkten DGK-Aktivität kann mit der IL-2-Expression zumindest eine der T-Zellfunktionen weitgehend wiederherstellen, was die wichtige Rolle von DGK beim Verursachen der Anergie in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen bestätigt.

### **4.7. Ausbildung der Immunologischen Synapse – Vergleich zwischen CXCR4<sub>WT</sub> und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen**

Zusätzlich zur Signaltransduktion sollte auch ein Blick auf die Ausbildung der Immunologischen Synapse geworfen werden. Eine stabile IS über mehrere Stunden ist Voraussetzung für das Aufrechterhalten der Signaltransduktion und damit das Einleiten der Immunantwort. Umgekehrt muss die Stabilität der IS durch Signaltransduktionsprozesse zwischen T-Zelle und APC vermittelt werden, welche z. B. Einfluss auf das Actinzytoskelett haben. Auch CXCR4 spielt eine Rolle bei der Stabilisierung der IS. Der Chemokinrezeptor wird während der Formierung der IS an die Kontaktfläche zwischen T-Zelle und APC rekrutiert, induziert durch von der APC gebildetes und sezerniertes SDF-1 $\alpha$ . Dort verstärkt er nach Bindung von SDF-1 $\alpha$  vermutlich die Adhäsion zwischen APC und T-Zelle durch Aktivierung von Integrinen und verhindert so ein Abwandern der T-Zelle in Richtung anderer SDF-1 $\alpha$ -Quellen. (Molon, 2006).

Da in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden T-Zellen eine mangelnde Reaktion auf das TCR vermittelte Stoppsignal beobachtet wurde (s. Abschnitt 4.3.1), stellte sich die Frage, ob der mutierte CXCR4-Rezeptor so wie der WT-Rezeptor zur IS rekrutiert wird. Desweiteren, falls diese Translokation ausbleiben würde, ob hierdurch möglicherweise eine Schwächung der Verbindung zwischen APC und T-Zelle entstehen könnte, die zur defekten Aktivierung in der Mutante beiträgt.

### 4.7.1. Translokation von CXCR4 zur IS

Molon et al. haben die Translokation von GFP-markiertem WT-CXCR4 zur IS in lebenden T-Zellen, welche mit verschiedenen behandelten B-Zellen aktiviert wurden, fluoreszenzmikroskopisch gezeigt. Dieses Experiment wurde zunächst wiederholt. Um dieses Ergebnis zu reproduzieren, wurden die T-Zellen jedoch nicht mit B-Zellen, sondern mit Mikrosphären, sogenannten „beads“ aktiviert, welche mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet waren. Es wurden auch „beads“ hergestellt, die zusätzlich zu den Antikörpern noch mit SDF-1 $\alpha$  beschichtet waren oder auch nur mit SDF-1 $\alpha$  alleine. Als Kontrolle wurden nur in PBS inkubierte „beads“ verwendet. Alle „beads“ wurden nach dem Beladen mit Proteinen in 1 %iger BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren.

Zunächst wurde das Ergebnis mit den WT-Zellen reproduziert. Um die Rekrutierung von CXCR4 an die Kontaktfläche zwischen APS und T-Zelle in lebenden Zellen beobachten zu können, wurde ein Konstrukt für WT-CXCR4 in Jurkat T-Zellen transfiziert, welches am C-Terminus mit GFP fusioniert war. Die transfizierten Zellen wurden zusammen mit den „beads“ im Verhältnis 1:1 zentrifugiert, um ein quantitatives Zusammenfinden von Zelle und „bead“ zu gewährleisten. Die resuspendierten Zellen wurden in Kammerdeckgläser pipettiert und nach dem Absetzen der Zellen nach ca. 1 h im konfokalen Mikroskop lebend beobachtet und für jede Versuchsbedingung 50 Zellen aufgenommen und ausgewertet.

„Beads“, die nur mit BSA oder SDF-1 $\alpha$  und BSA behandelt worden waren, banden nicht an die Zellen. Im Gegensatz dazu hefteten sich bei Behandlung mit anti-CD3/anti-CD28-beschichteten „beads“ bei über 90 % der Zellen ein oder mehrere „beads“ an die Zellen an.

In der Abwesenheit von SDF-1 $\alpha$  an den „beads“ war der Rezeptor gleichmäßig über die Zellmembran verteilt (Abb. 8.20 1. Zeile, 46 von 50 Zellen). Waren die „beads“ zusätzlich mit SDF-1 $\alpha$  beschichtet, so konnte eine deutliche Translokation von CXCR4 zur Kontaktstelle mit dem „bead“ beobachtet werden (3. Zeile, 46 von 50 Zellen). D. h. die Beobachtungen von Molon et al. an Synapsen von B- und T-Zellen konnten mit durch beschichtete „beads“ erzeugten Pseudosynapsen reproduziert werden. WT-CXCR4 wird zur IS rekrutiert, aber nur dann, wenn dort eine hohe



Konzentration von SDF-1 $\alpha$  durch Sekretion aus der B-Zelle bzw. das getränkte „bead“ herrscht.

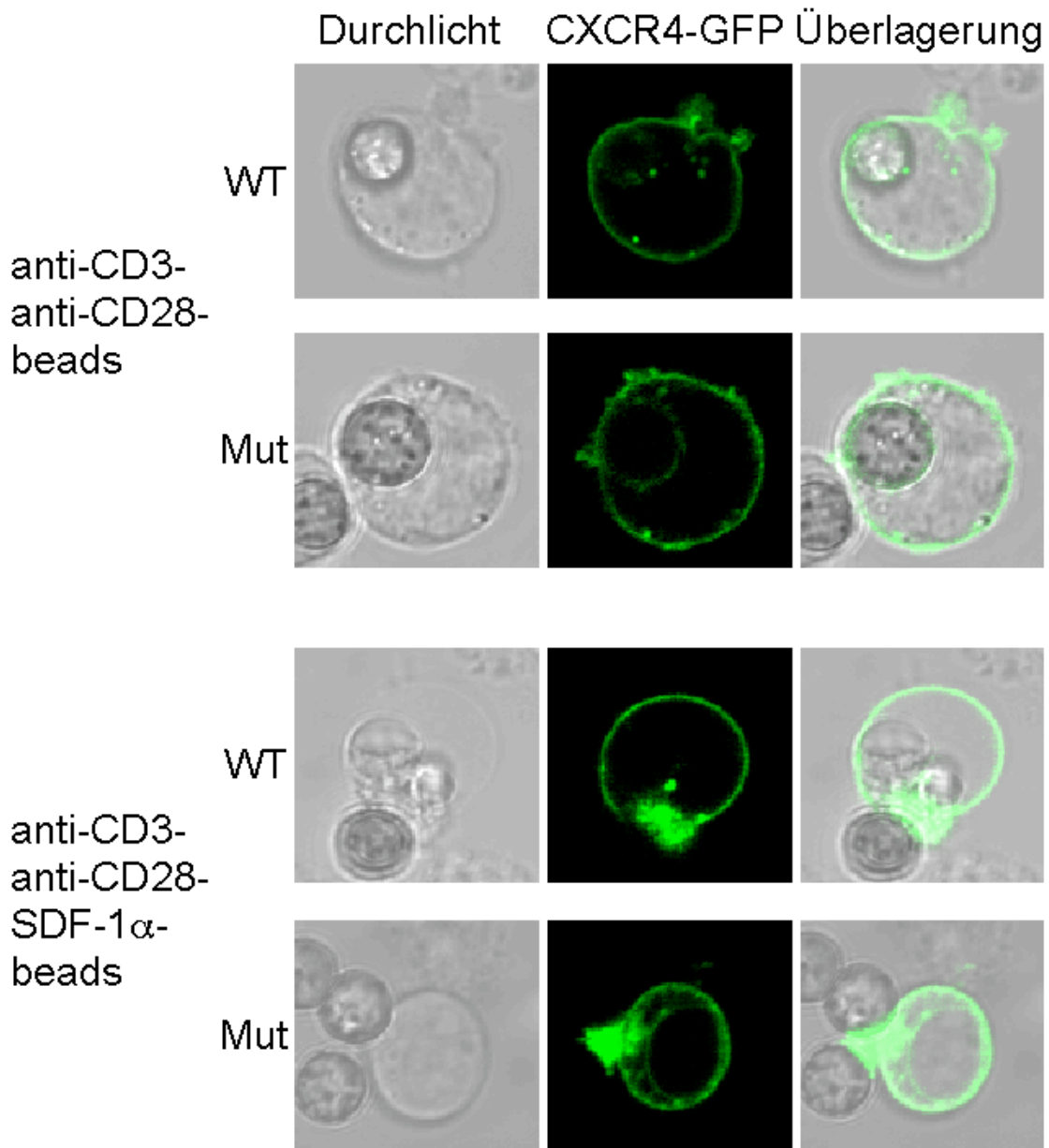


Abb. 4.20: Translokation von CXCR4 zur Immunologischen Synapse (zwischen T-Zelle und „bead“)

Nachdem bestätigt war, dass die Rekrutierung von CXCR4 an die Synapse auch mit „beads“ funktionierte, wurde die C-terminal GFP-markierte Mutante in Jurkat T-Zellen exprimiert und das Experiment mit denselben Bedingungen wiederholt. Mit anti-CD3/anti-CD28-beschichteten „beads“ konjugierte Zellen zeigten wie die WT transfizierten Zellen eine gleichmäßige Verteilung von CXCR4 über die gesamte Zellmembran (2. Zeile, 49 von 50 Zellen). Waren die „beads“ zusätzlich mit SDF-1 $\alpha$

beschichtet, zeigte nicht nur der WT, sondern auch der mutierte CXCR4-Rezeptor eine deutliche Translokation zur IS (4. Zeile, 47 von 50 Zellen).

D. h. die Rekrutierung von CXCR4 zur IS wird durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Ob der mutierte Rezeptor dort durch direkte Mechanismen die Ausbildung der Synapse behindert oder die Verbindung zwischen APC und T-Zelle als Sekundäreffekt aufgrund der gestörten Signaltransduktion gelöst wird, muss demnach weiter untersucht werden.

## 5. Diskussion

Das WHIM-Syndrom ist eine autosomal dominante Erbkrankheit, deren Ursache lange unbekannt war. Erst vor kurzem wurde sie auf die Mutation des Chemokinrezeptors CXCR4 zurückgeführt (Hernandez *et al.*, 2003). Über die Auswirkungen der in WHIM-Syndrom-Patienten gefundenen Deletion des C-Terminus von CXCR4 auf zellulärer Ebene ist bisher nur wenig bekannt. Da die Träger des defekten Allels an Immunschwäche verschiedenartiger Ausprägung leiden und CXCR4 wichtig für verschiedene T-Zellfunktionen (Migrations- und Retentionsprozesse, Homöostase, Aktivierung) ist, liegt es nahe, T-Zellen auf durch die CXCR4-Mutation verursachte Veränderungen zu untersuchen, um die Immunschwäche erklären zu können. Ein besseres Verständnis der Ursachen der Immundefizienz wird möglicherweise dazu beitragen, neue vorbeugende Therapieansätze zu finden. Da das WHIM-Syndrom die erste bekannte erbliche Krankheit ist, die durch Mutation eines Chemokinrezeptors verursacht ist, stellt es darüber hinaus ein interessantes Modell dar, anhand dessen man mehr über die Funktionen von CXCR4 und seines Liganden SDF-1 $\alpha$  erfahren kann.

### 5.1. Etablierung eines *in-vitro* T-Zell-Modells für das WHIM-Syndrom

Da Material von Patienten zur Gewinnung von T-Zellen sehr begrenzt ist und nur schwer zugänglich zur Verfügung steht, ist es sinnvoll, ein Zellkultur-Modell zu entwickeln, das die Verhältnisse in T-Zellen von WHIM-Syndrom-Patienten imitiert. Nur so werden Experimente möglich, bei denen z. B. hohe Zellzahlen in den einzelnen Versuchsbedingungen benötigt werden. Durch Transfektion der entsprechenden Konstrukte in die humane T-Zelllinie Jurkat wurden Klone generiert, welche entweder WT CXCR4 oder CXCR4<sub>WHIM</sub> Doxycyclin induzierbar exprimierten.

Bei der Stärke der Proteinexpression gab es eine klonale Variation. Einige der Klone zeigten auch eine geringe Expression ohne Behandlung mit Doxycyclin. Das kann durch Positionseffekte bei der genomischen Integration der Sequenzen des rTA-tragenden Konstrukts, bzw. des TRE-CXCR4<sub>WT</sub>-, bzw. TRE-CXCR4<sub>WHIM</sub>-Konstrukts verursacht sein, beispielsweise durch Insertion stromabwärts von starken

konstitutiven Promotoren oder von Promotoren, die Serum-responsive Enhancer-Elemente besitzen (vgl. Abb. 4.2). Bei manchen Klonen ging die Induzierbarkeit der Expression ganz verloren und das Protein wurde konstitutiv exprimiert, was durch Verlust des regulatorischen Elements bei der Integration des Vektors ins Genom erklärt werden kann.

Die CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen wurden in allen Experimenten mit WT CXCR4 transfizierten Zellen verglichen, welche eine ähnliche Menge an rekombinantem CXCR4 exprimieren, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nur auf die Überexpression von CXCR4 und nicht die Mutation selbst zurückzuführen sind.

Zunächst wurden zwei Ergebnisse im Modell reproduziert, welche aus Experimenten in primären Zellen von Patienten veröffentlicht waren. Dies waren die defekte Internalisierung von CXCR4<sub>WHIM</sub> und eine verstärkte und verlängerte Calciumantwort nach Stimulation mit SDF-1 $\alpha$  im Vergleich mit WT CXCR4.

Die defekte Internalisierung der Mutante lässt sich mit der Abwesenheit einiger regulierender Phosphorylierungsstellen (I328, L329, S338, S339) (Haribabu *et al.*, 1997) durch die Deletion des zytoplasmatischen C-Terminus von CXCR4 erklären. Deren Phosphorylierung durch GRK2 bzw. PKC nach Bindung durch SDF-1 $\alpha$  erlaubt das Binden von Arrestinen und damit die Initiierung der Internalisierung und Desensitivierung des Rezeptors (vgl. Abschnitt 1.1.4). Folglich könnte dadurch auch das Abschalten der SDF-1 $\alpha$  induzierten Signalwege gestört sein.

In der Tat wurde eine auf drei Arten deregulierte Calciumantwort in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen gefunden: 1. Der basale Calciumspiegel war leicht erhöht; 2. Das Maximum der Calciumspitze relativ zum jeweiligen Basallevel war größer; 3. Die Calciumantwort klang langsamer ab als in WT-Zellen. Der leicht erhöhte basale Calciumspiegel lässt darauf schließen, dass die Mutante eine gewisse Grundaktivität in der Abwesenheit des Liganden SDF-1 $\alpha$  zeigt (s.u.).

Der Unterschied zwischen WT und Mutante in der Calciumspitze fiel etwas kleiner aus als in der Studie mit den transfizierten humanen Stammzellen (Kawai *et al.*, 2005), die Beobachtungen entsprechen jedoch qualitativ alle drei der Studie von (Hernandez *et al.*, 2003), der eine dreimal so hohe und länger anhaltende Calcium-

Antwort in Lymphoblastoidzellen aus WHIM-Syndrom-Patienten nachweisen konnte. Damit widersprechen die Ergebnisse der in isolierten T-Zellen von Patienten gemachten Beobachtung von Gulino (2003), der keinen Unterschied zwischen WT und Mutante gefunden hatte. Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf Unterschiede in den in der Literatur verwendeten Zellsystemen zurückgeführt werden.

Durch die Reproduktion dieser zwei Ergebnisse aus primären T-Zellen von WHIM-Syndrom-Patienten wurde das Zellmodell validiert und ist somit geeignet für die weitere Untersuchung der Auswirkungen der WHIM-Syndrom CXCR4-Mutation auf T-Zellfunktionen. Man kann annehmen, dass weitere im Modell erzielte Ergebnisse für die Pathogenese des WHIM-Syndroms in Patienten relevant sein können.

### **5.2. CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierende T-Zellen weisen Defekte der T-Zell-Aktivierung auf**

Da T-Zellen eine wichtige Funktion in der spezifischen Immunantwort spielen und die WHIM-Syndrom-Patienten eine Immunschwäche zeigen, wurden wichtige funktionale Aspekte der T-Zellaktivierung im Modell untersucht.

Treffen T-Zellen auf eine APC, die das passende Antigen präsentiert, erhalten sie zunächst ein Stoppsignal. Dies ist die erste Voraussetzung zum Ausbilden eines stabilen Kontakts zwischen den beiden Zellen und der Formierung der IS. Nur eine über mehrere Stunden stabile IS führt zu einer produktiven Immunantwort.

Die CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen zeigten im Chemotaxistest eine im Vergleich zu WT Zellen gestörte Antwort auf das durch TCR-Stimulation generierte Stoppsignal und migrierten ebenso stark wie unstimulierte Zellen in Richtung eines SDF-1 $\alpha$ -Gradienten (s. Abb. 4.5). Dies kann durch Unterbrechen des eingehenden Stoppsignals auf Ebene der Signaltransduktion oder aufgrund einer Störung der für die Ausbildung der IS notwendigen Effektorfunktionen verursacht sein. CXCR4 könnte eine Rolle beim Formieren der IS durch Verstärkung des Zell-Zellkontakts spielen, da es zur IS rekrutiert wird und dort Integrine aktivieren kann (Molon *et al.*, 2005). Eine defekte Translokation von CXCR4<sub>WHIM</sub> in den Bereich der Grenzfläche zwischen T-Zelle und APC könnte zu einer Schwächung der Wechselwirkung zwischen den Zellen führen, wurde jedoch nicht beobachtet. CXCR4<sub>WHIM</sub> translozierte ebenso wie der WT an die Zellmembranfläche der IS, d. h. eine gestörte Rekrutierung

des Rezeptors zur IS liegt nicht vor und kann daher nicht der Grund für die Labilität der Wechselwirkung sein. Darüber, ob der mutierte Rezeptor an der Kontaktstelle mit der APC z. B. durch Störung der Effektorfunktionen die Bildung einer stabilen IS verhindert, kann momentan nur spekuliert werden.

Durch das Ausbilden einer produktiven IS werden die T-Zellen aktiviert. Ein wesentliches Merkmal der Aktivierung ist die Produktion von IL-2, durch das in einer autokrinen Feedback-Schleife die klonale Expansion durch Proliferation und Differenzierung zu einer Armee von T-Effektorzellen einleitet. Die Produktion von IL-2 wird u. a. vom TF NFAT kontrolliert.

Sowohl die Aktivierung von NFAT (s. Abb. 4.6) als auch die Produktion von IL-2 (s. Abb. 4.7) war in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen gestört. Nach T-Zell-Aktivierung zeigte sich in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen im Vergleich zu WT-Zellen eine stark reduzierte NFAT-Aktivierung sowie keine messbare IL-2-Sekretion. Infolgedessen war die Induktion der Proliferation in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden T-Zellen gestört (s. Abb. 4.8).

Die TCR-Stimulierung erfolgte in all diesen Experimenten durch Quervernetzen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern, d. h. unabhängig vom natürlichen Ausbilden einer IS. Somit ist gesichert, dass es einen Defekt der T-Zellaktivierung auf Ebene der Signaltransduktion geben muss.

### **5.3. CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierende T-Zellen zeigen nach TCR-Stimulierung eine gestörte Signaltransduktion**

Die Signale, welche die Bindung der Liganden an den TCR und den Corezeptor generiert, werden in verschiedenen Signalwegen integriert, um eine produktive Immunantwort mit IL-2-Produktion und Proliferation der Zellen zu erzeugen. Ein wichtiger Signalweg zur Vermittlung von IL-2-Produktion und Proliferation ist der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg.

In der Tat wurde eine verminderte Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade auf dem Level von MEK und ERK in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen im Vergleich zum WT gefunden (s. Abb. 4.14). Aus unserem Labor ist ein Mechanismus bekannt, durch den SDF-1 $\alpha$  IL-2 induzierte Proliferation von T-Zellen

vermindert. Dabei inhibiert Rho A den Rac-Pak-Signalweg, der für Phosphorylierung von Raf an Position Serin 338 verantwortlich ist, die für die Aktivierung von MEK essentiell ist (King *et al.*, 1998; Zang *et al.*, 2002). TCR induzierte Proliferation wird in WT-Zellen allerdings nicht inhibiert. Unsere Hypothese war, dass durch die deregulierte Aktivität von CXCR4<sub>WHIM</sub> auch die Aktivität von Rho A erhöht würde und Dominanz über die herunterregulierende Wirkung des TCR auf Rho A erlangen könnte. Auf diese Weise könnte in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen auch TCR induzierte Proliferation inhibiert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Gegenteil der Fall war. Die basale Rho A-Aktivität in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen lag unter der in WT-Zellen und es konnte keine Erhöhung der Aktivität durch SDF-1 $\alpha$ -Behandlung detektiert werden (s. Abb. 4.15). Damit war der Mechanismus der Rho A vermittelten Inhibierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs als Ursache für den Defekt der T-Zell-Aktivierung ausgeschlossen.

Daher wurde untersucht, ob Moleküle weiter oben in der Signaltransduktion zwischen TCR und Ras auch eine verminderte Aktivität aufweisen, was die defekte Aktivierung von MEK und ERK nach sich ziehen würde. Tatsächlich war auch LAT, ein wichtiges Glied in der T-Zellaktivierung, in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden T-Zellen deutlich weniger aktiv als in WT-Zellen. Wichtige TCR-proximale Signalmoleküle wie Lck und ZAP-70 wurden hingegen nach TCR-Stimulierung noch vollständig aktiviert. Eine Inhibierung der TCR-Signaltransduktion durch eine veränderte Signalübertragung in T-Zellen, die den mutierten Rezeptor tragen, kann also nur auf der Ebene unterhalb von ZAP-70 erfolgen.

### **5.4. CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierende T-Zellen zeigen Merkmale anergischer T-Zellen**

Ausbleibende IL-2-Produktion und Proliferation nach TCR-Aktivierung sind definierende Merkmale von anergischen T-Zellen. In diesen Zellen wird durch verschiedene Signale und Mechanismen u. a. eine Störung der Balance in der Aktivierung der TF NFAT und AP-1 die Aktivität und Expression verschiedener Proteine, u. a. Tyrosinphosphatasen, Proteasen und E3 Ubiquitinligasen, verändert, wodurch die T-Zellaktivierung auf mehreren Ebenen gestört wird. So wurde z. B. über eine verminderte Aktivierung des Ras-Signalwegs in anergischen T-Zellen berichtet, der die Aktivierung von AP-1 vermittelt (s. Abschnitt 1.3.4).

Der Mechanismus, über den die Ras-Aktivität vermindert wird, konnte vor kurzem geklärt werden. Durch in anergen T-Zellen vermehrt exprimierte DGK wird DAG abgebaut, welches in T-Zellen Ras aktiviert. Überexpression von konstitutiv aktivem Ras oder die Behandlung aneurer T-Zellen mit einem DGK-Inhibitor konnte IL-2-Produktion und Proliferation wiederherstellen (Zha *et al.*, 2006). In CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen wurde daraufhin die DGK-Expression mit der in WT-Zellen verglichen und war in der Tat erhöht (s. Abb. 4.17). Durch Inhibierung von DGK mit einem spezifischen Inhibitor konnte die Signaltransduktion unterhalb von Ras wiederhergestellt werden (s. Abb. 4.18). Diese Überbrückung der gestörten Signaltransduktion reichte auch aus, um die T-Zellfunktion partiell wiederherzustellen, was durch eine signifikante Anhebung der IL-2-Produktion in DGK I behandelten CXCR4<sub>WHIM</sub>-T-Zellen gezeigt wurde (s. Abb. 4.19).

Die erhöhte Expression von DGK ist jedoch nicht der alleinige Verursacher der Anergie in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen, da LAT, welches auch von der Inhibierung der Signaltransduktion betroffen ist, in der Signalkaskade oberhalb von DAG liegt. Es muss also noch weitere Mechanismen geben, durch die das Anergieprogramm weiter oben in die Signaltransduktion eingreift. Durch Inhibierung von DGK wird die Signalkaskade stromabwärts von DAG/Ras wiederhergestellt, was die unverändert reduzierte Phosphorylierung von LAT in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen nach DGK I-Behandlung zeigt (s. Abb. 4.18).

CXCR4<sub>WHIM</sub> könnte die Anergie durch den ständig leicht erhöhten Calciumspiegel verursachen. Ein übereinstimmendes Merkmal verschiedener Anergie verursachender Stimuli ist ihre Fähigkeit, den intrazellulären Calciumspiegel über längere Zeit gering anzuheben (Sloan-Lancaster *et al.*, 1996), wodurch NFAT aktiviert wird (s. Abschnitt 1.3.4). So kann Anergie auch künstlich durch das Calciumionophor Ionomycin aktiviert und durch Calciumchelatoren verhindert werden (Macian *et al.*, 2002). Es ist anhand der hier gefundenen Ergebnisse jedoch nicht anzunehmen, dass dieser Mechanismus in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden T-Zellen eine kausale Rolle für die Erzeugung der Anergie spielt, da bereits die basale und auch die induzierte NFAT-Aktivität im Vergleich zu CXCR4<sub>WT</sub> exprimierenden Zellen reduziert war (s. Abb. 4.6). Der hierfür relevante Mechanismus und auch der CXCR4<sub>WHIM</sub> abhängige Signalweg, der für die vermehrte Expression von DGK in CXCR4<sub>WHIM</sub>-Zellen verantwortlich ist, muss in weitergehenden Untersuchungen noch geklärt werden.



Die Veränderungen durch das CXCR4<sub>WHIM</sub>-spezifische Anergieprogramm haben auch Auswirkungen auf die Aktivierung von Rho A durch SDF-1 $\alpha$ , die mit der hier verwendeten GST-Affinitätspräzipitation in CXCR4<sub>WHIM</sub>-Zellen – im Gegensatz zu CXCR4<sub>WT</sub>-Zellen – nicht detektiert werden konnte. Dies könnte durch unterschiedliche Mechanismen verursacht sein. Möglicherweise ist in CXCR4<sub>WHIM</sub>-Zellen ein Rho A-GAP oder ein GDI hochreguliert oder ein GEF wird inaktiviert. Alternativ könnte die Aktivierung von Rho A von intrazellulärer Signaltransduktion durch den internalisierten Rezeptor abhängen, die in CXCR4<sub>WHIM</sub>-Zellen verhindert wird. Andererseits zeigten die CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen immer noch Chemotaxis in Richtung SDF-1 $\alpha$ , bei der Rho A eine Rolle spielt. Dieser Widerspruch könnte durch die Beschränkung der Aktivierung von Rho A auf bestimmte Zellkompartimente erklärt werden, die mit dem hier verwendeten Assay in CXCR4<sub>WHIM</sub>-Zellen nicht mehr detektiert werden konnte.

Aus den erhobenen Befunden lässt sich schließen, dass die CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen ein Anergieprogramm einschalten, das Parallelen, aber auch Unterschiede zu den in der Literatur beschriebenen physiologischen Anergieprogrammen aufweist (Abb. 5.1). Die defekte IL-2-Expression und Proliferation nach TCR-Stimulierung durch fehlende Aktivierung des ERK-Signalwegs stimmen mit veröffentlichten Ergebnissen aus anergen Zellen überein. Über die Beeinflussung der Aktivität von ZAP-70 und LAT in anergen Zellen wurde in der Literatur noch nicht berichtet. Die Unfähigkeit anergischer Zellen, eine stabile IS aufzubauen und aufrechtzuerhalten (Heissmeyer *et al.*, 2004), steht im Einklang mit dem Ergebnis, dass CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierende Zellen das Stoppsignal durch TCR-Aktivierung nicht umsetzen.

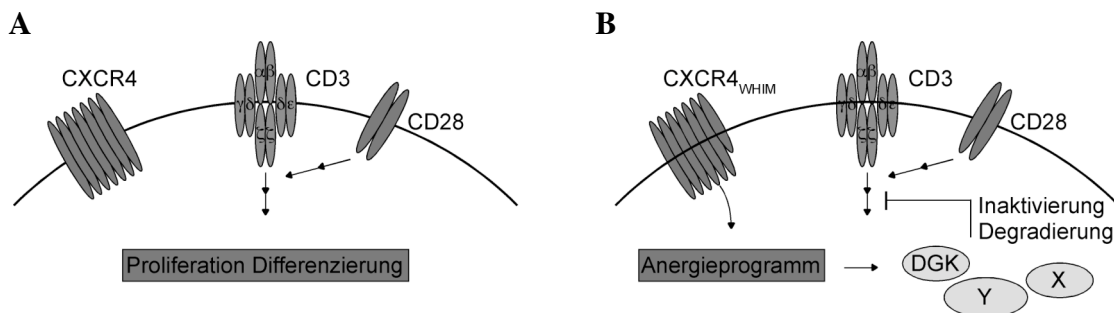


Abb. 5.1: Modell zur Verursachung von Anergie durch CXCR4<sub>WHIM</sub>, **A** Signaltransduktion in WT-Zellen, **B** Situation in CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen

Es fallen jedoch auch Abweichungen auf, wie die verminderte NFAT-Aktivierung in CXCR4<sub>WHIM</sub>-Zellen trotz erhöhter intrazellulärer Calcium-Spiegel. Wie weit die durch CXCR4<sub>WHIM</sub> verursachte Anergie mit der aus vorher beschriebenen anergen T-Zellen identisch ist oder ob weitere Unterschiede bestehen, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Eine vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen WT CXCR4 und CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierenden Zellen könnte hierbei hilfreich sein. Macián et al. (2002) haben auf diese Weise in durch Ionomycin-Behandlung anerg gemachten Zellen Moleküle identifiziert, welche die Signaltransduktion der T-Zellaktivierung negativ beeinflussen könnten, z. B. Tyrosinphosphatasen, Proteasen und E3 Ubiquitinligasen.

### 5.5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkultur-Modell erstellt, validiert und genutzt, um die gestörten Funktionen der T-Zellaktivierung durch die WHIM-Syndrom CXCR4-Mutation zu untersuchen und deren Ursachen aufzudecken und so mehr über die Pathophysiologie der Erkrankung zu erfahren. Offensichtlich weisen CXCR4<sub>WHIM</sub> exprimierende T-Zellen eine stark gestörte T-Zellaktivierung auf, die viele Merkmale aneurer T-Zellen wie fehlende IL-2-Produktion und Proliferation reproduziert und somit als ein Anergie-Analogon interpretiert werden kann. Die anergen T-Zellen tragen sicher zur Immunschwäche von Trägern des WHIM-Syndroms bei, z. B. zur Anfälligkeit für Infektionen. Andererseits spielt CXCR4 auch eine wichtige Rolle für Migration und Aktivierung von anderen Zellen des Immunsystems, z. B. dendritischen Zellen, B-Zellen oder Makrophagen. Daher sollten auch sie auf durch CXCR4<sub>WHIM</sub> verursachte Fehlfunktionen untersucht werden.

Ein T-Zellmodell wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, bietet einerseits Vorteile wie Unabhängigkeit von Patientenblut zur Zellgewinnung und uneingeschränkte Verfügbarkeit von Zellen für Experimente, die hohe Zellzahlen erfordern. Andererseits muss die physiologische Relevanz der erhobenen Daten letztendlich doch *in-vivo* überprüft werden. Dazu könnten auch Mausmodelle des WHIM-Syndroms beitragen. Das Modell, das dem humanen WHIM-Syndrom 1:1 entsprechen würde, wäre ein knock-in mit dem mutierten Allel. Es wäre auch eine transgene Expression von CXCR4<sub>WHIM</sub> neben beiden natürlichen Allelen möglich, die

technisch einfacher ist. Diese könnte auch induzierbar und durch Wahl geeigneter Promotoren Zelltyp spezifisch z. B. in T-Zellen erfolgen.

Warum WHIM-Syndrom-Patienten speziell für Infektionen mit HPV empfänglich sind, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht erklärt werden. Es gibt Anhaltspunkte, dass die Infiltration HPV infizierter Läsionen durch Lymphozyten eine Voraussetzung für das Ausbilden von Warzen ist. Dabei spielt die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen durch CXCR4 in den Lymphozyten eine Rolle, die durch SDF-1 $\alpha$ -Sekretion von Keratinozyten angelockt werden (Balabanian *et al.*, 2005). Somit könnte die verstärkte Aktivität von CXCR4<sub>WHIM</sub> die Infektion mit HPV und die Entstehung von Warzen begünstigen.

Aus einem besseren Verständnis der zellulären Defekte können neue therapeutische Strategien zur Verbesserung der gesundheitlichen Situation der Patienten resultieren. Sicher wäre es ein Ziel, die Anergie der T-Zellen aufzuheben. Ein DGK-Inhibitor wäre dazu unter der Voraussetzung geeignet, dass es gelingt, ihn gezielt in die betroffenen Zellen einzuschleusen, um so systemische Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Eine Behandlung mit einem CXCR4-Antagonisten scheint anhand der Ergebnisse wenig Erfolg versprechend, da im Experiment die Anergie damit nicht verhindert werden konnte.

Folglich sind weitere Anstrengungen notwendig, um die zellulären Auswirkungen der CXCR4-Mutation weiter zu erforschen und möglicherweise durch Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze den Trägern der Krankheit zu einem unbeschwerteren Leben zu verhelfen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbal, C., Jourdan, P., Hori, T., Bousquet, J., Yssel, H., and Pene, J. (1999). TCR-mediated activation of allergen-specific CD45RO(+) memory T lymphocytes results in down-regulation of cell-surface CXCR4 expression and a strongly reduced capacity to migrate in response to stromal cell-derived factor-1. *Int Immunol* *11*, 1451-1462.
- Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* *383*, 787-793.
- Ahr, B., Denizot, M., Robert-Hebmann, V., Brelot, A., and Biard-Piechaczyk, M. (2005). Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation. *J Biol Chem* *280*, 6692-6700.
- Aiuti, A., Taviani, M., Cipponi, A., Ficara, F., Zappone, E., Hoxie, J., Peault, B., and Bordignon, C. (1999). Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *Eur J Immunol* *29*, 1823-1831.
- Amara, A., Gall, S.L., Schwartz, O., Salamero, J., Montes, M., Loetscher, P., Baggiolini, M., Virelizier, J.L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1997). HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* *186*, 139-146.
- Ansel, K.M., and Cyster, J.G. (2001). Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol* *13*, 172-179.
- Ara, T., Itoi, M., Kawabata, K., Egawa, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Fujii, N., Amagai, T., and Nagasawa, T. (2003). A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* *170*, 4649-4655.
- Arnold, B., Schonrich, G., and Hammerling, G.J. (1993). Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today* *14*, 12-14.
- Baekkevold, E.S., Yamanaka, T., Palframan, R.T., Carlsen, H.S., Reinholt, F.P., von Andrian, U.H., Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (2001). The CCR7 ligand e1c (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* *193*, 1105-1112.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., Nicolas, J.F., Latger-Cannard, V., Bensoussan, D., Bordignon, P., Baleux, F., Le Deist, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Bachelier, F. (2005). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* *105*, 2449-2457.
- Becker, J.C., Brabletz, T., Kirchner, T., Conrad, C.T., Brocker, E.B., and Reisfeld, R.A. (1995). Negative transcriptional regulation in anergic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 2375-2378.
- Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning,

- A.M., and Anderson, D.W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13681-13686.
- Bensinger, S.J., Walsh, P.T., Zhang, J., Carroll, M., Parsons, R., Rathmell, J.C., Thompson, C.B., Burchill, M.A., Farrar, M.A., and Turka, L.A. (2004). Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172, 5287-5296.
- Berson, J.F., Long, D., Doranz, B.J., Rucker, J., Jirik, F.R., and Doms, R.W. (1996). A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 70, 6288-6295.
- Beverly, B., Kang, S.M., Lenardo, M.J., and Schwartz, R.H. (1992). Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int Immunol* 4, 661-671.
- Blades, M.C., Manzo, A., Ingegnoli, F., Taylor, P.R., Panayi, G.S., Irjala, H., Jalkanen, S., Haskard, D.O., Perretti, M., and Pitzalis, C. (2002). Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) induces human cell migration into human lymph nodes transplanted into SCID mice. *J Immunol* 168, 4308-4317.
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.
- Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., and Mackay, C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1925-1930.
- Boussiotis, V.A., Barber, D.L., Nakarai, T., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Bernstein, G.M., D'Andrea, A.D., Ritz, J., and Nadler, L.M. (1994). Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science* 266, 1039-1042.
- Cantrell, D.A. (2002). T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* 105, 369-374.
- Chae, K.M., Ertle, J.O., and Tharp, M.D. (2001). B-cell lymphoma in a patient with WHIM syndrome. *J Am Acad Dermatol* 44, 124-128.
- D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J.A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol* 27, 1788-1793.
- DeSilva, D.R., Urdahl, K.B., and Jenkins, M.K. (1991). Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J Immunol* 147, 3261-3267.
- Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., and Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151, 1224-1234.
- Ding, L., and Shevach, E.M. (1992). IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 148, 3133-3139.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Kopranner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647-659.
- Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Este, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J.P. (1998). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 4, 72-77.

- Dustin, M.L. (2003). Coordination of T cell activation and migration through formation of the immunological synapse. *Ann N Y Acad Sci* 987, 51-59.
- Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A., and Unanue, E.R. (1997). Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3909-3913.
- Federspiel, B., Melhado, I.G., Duncan, A.M., Delaney, A., Schappert, K., Clark-Lewis, I., and Jirik, F.R. (1993). Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* 16, 707-712.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- Ferguson, S.S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53, 1-24.
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L., and Keen, J.H. (1999). Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *Embo J* 18, 871-881.
- Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273, 23169-23175.
- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.
- Gorlin, R.J., Gelb, B., Diaz, G.A., Lofsness, K.G., Pittelkow, M.R., and Fenyk, J.R., Jr. (2000). WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet* 91, 368-376.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184, 19-29.
- Gulino, A.V. (2003). WHIM syndrome: a genetic disorder of leukocyte trafficking. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3, 443-450.
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raullet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609.
- Haribabu, B., Richardson, R.M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S.C., Horuk, R., Ali, H., and Snyderman, R. (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem* 272, 28726-28731.
- Heesen, M., Berman, M.A., Benson, J.D., Gerard, C., and Dorf, M.E. (1996). Cloning of the mouse fusin gene, homologue to a human HIV-1 co-factor. *J Immunol* 157, 5455-5460.
- Heesen, M., Berman, M.A., Hopken, U.E., Gerard, N.P., and Dorf, M.E. (1997). Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms. *J Immunol* 158, 3561-3564.
- Heissmeyer, V., Macian, F., Im, S.H., Varma, R., Feske, S., Venuprasad, K., Gu, H., Liu, Y.C., Dustin, M.L., and Rao, A. (2004). Calcineurin imposes T cell

- unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol* 5, 255-265.
- Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., and Diaz, G.A. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 34, 70-74.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89-95.
- Imashuku, S., Miyagawa, A., Chiyonobu, T., Ishida, H., Yoshihara, T., Teramura, T., Kuriyama, K., Imamura, T., Hibi, S., Morimoto, A., and Todo, S. (2002). Epstein-Barr virus-associated T-lymphoproliferative disease with hemophagocytic syndrome, followed by fatal intestinal B lymphoma in a young adult female with WHIM syndrome. Warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis. *Ann Hematol* 81, 470-473.
- Jenkins, M.K., Chen, C.A., Jung, G., Mueller, D.L., and Schwartz, R.H. (1990). Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol* 144, 16-22.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165, 302-319.
- Jutila, M.A., Berg, E.L., Kishimoto, T.K., Picker, L.J., Bargatze, R.F., Bishop, D.K., Orosz, C.G., Wu, N.W., and Butcher, E.C. (1989). Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils, and monocytes. Role of homing receptors and other adhesion molecules. *Transplantation* 48, 727-731.
- Kang, S.M., Beverly, B., Tran, A.C., Brorson, K., Schwartz, R.H., and Lenardo, M.J. (1992). Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 257, 1134-1138.
- Kawai, T., Choi, U., Whiting-Theobald, N.L., Linton, G.F., Brenner, S., Sechler, J.M., Murphy, P.M., and Malech, H.L. (2005). Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome. *Exp Hematol* 33, 460-468.
- King, A.J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., and Marshall, M.S. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396, 180-183.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., and Nusslein-Volhard, C. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421, 279-282.
- Kobayashi, N., Takata, H., Yokota, S., and Takiguchi, M. (2004). Down-regulation of CXCR4 expression on human CD8+ T cells during peripheral differentiation. *Eur J Immunol* 34, 3370-3378.
- Kremer, K.N., Humphreys, T.D., Kumar, A., Qian, N.X., and Hedin, K.E. (2003). Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. *J Immunol* 171, 360-367.
- Krill, C.E., Jr., Smith, H.D., and Mauer, A.M. (1964). Chronic Idiopathic Granulocytopenia. *N Engl J Med* 270, 973-979.
- Krueger, K.M., Daaka, Y., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. *Regulation of beta2-*

- adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272, 5-8.
- Krupnick, J.G., and Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319.
- Kumar, A., Humphreys, T.D., Kremer, K.N., Bramati, P.S., Bradfield, L., Edgar, C.E., and Hedin, K.E. (2006). CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity* 25, 213-224.
- Kyewski, B., and Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4, 688-698.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamb, J.R., Skidmore, B.J., Green, N., Chiller, J.M., and Feldmann, M. (1983). Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med* 157, 1434-1447.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G., and Barak, L.S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3712-3717.
- Lee, Y., Gotoh, A., Kwon, H.J., You, M., Kohli, L., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., and Broxmeyer, H.E. (2002). Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* 99, 4307-4317.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B., and Schlessinger, J. (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376, 737-745.
- Levesque, J.P., Hendy, J., Takamatsu, Y., Simmons, P.J., and Bendall, L.J. (2003). Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 111, 187-196.
- Li, Q., Shirabe, K., and Kuwada, J.Y. (2004). Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish. *Dev Biol* 269, 123-136.
- Li, Q., Shirabe, K., Thisse, C., Thisse, B., Okamoto, H., Masai, I., and Kuwada, J.Y. (2005). Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish. *J Neurosci* 25, 1711-1717.
- Li, W., Whaley, C.D., Mondino, A., and Mueller, D.L. (1996). Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 271, 1272-1276.
- Liles, W.C., Rodger, E., Broxmeyer, H.E., Dehner, C., Badel, K., Calandra, G., Christensen, J., Wood, B., Price, T.H., and Dale, D.C. (2005). Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* 45, 295-300.
- Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 232-237.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., and Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis,



- myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9448-9453.
- Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C., and Rao, A. (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109, 719-731.
- Marchese, A., and Benovic, J.L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276, 45509-45512.
- Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J.H., Stenmark, H., and Benovic, J.L. (2003). The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* 5, 709-722.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Moepps, B., Frodl, R., Rodewald, H.R., Baggiolini, M., and Gierschik, P. (1997). Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1alpha activation of Gi2 are differentially expressed in vivo. *Eur J Immunol* 27, 2102-2112.
- Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A.C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6, 465-471.
- Mueller, D.L., Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1989). An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *J Immunol* 142, 2617-2628.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996a). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Nature* 382, 635-638.
- Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2305-2309.
- Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C.C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T.A., and Kishimoto, T. (1996b). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14726-14729.
- Nanki, T., and Lipsky, P.E. (2000). Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation. *J Immunol* 164, 5010-5014.
- Nanki, T., and Lipsky, P.E. (2001). Stimulation of T-Cell activation by CXCL12/stromal cell derived factor-1 involves a G-protein mediated signaling pathway. *Cell Immunol* 214, 145-154.
- Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H., and Cahalan, M.D. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 4, 421-430.
- Nelson, P.J., and Krensky, A.M. (1998). Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol* 10, 265-270.

- Nomura, H., Nielsen, B.W., and Matsushima, K. (1993). Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int Immunol* 5, 1239-1249.
- Norment, A.M., and Bevan, M.J. (2000). Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol* 12, 445-455.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.
- Okada, T., Ngo, V.N., Ekland, E.H., Forster, R., Lipp, M., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* 196, 65-75.
- Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Benovic, J.L., and Marchese, A. (1999). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem* 274, 31076-31086.
- Otten, G.R., and Germain, R.N. (1991). Split anergy in a CD8+ T cell: receptor-dependent cytolysis in the absence of interleukin-2 production. *Science* 251, 1228-1231.
- Pablos, J.L., Amara, A., Bouloc, A., Santiago, B., Caruz, A., Galindo, M., Delaunay, T., Virelizier, J.L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1999). Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol* 155, 1577-1586.
- Papayannopoulou, T., Priestley, G.V., Bonig, H., and Nakamoto, B. (2003). The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 101, 4739-4747.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R.S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., Sandbank, J., Zipori, D., and Lapidot, T. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3, 687-694.
- Phillips, R., and Ager, A. (2002). Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. *Eur J Immunol* 32, 837-847.
- Quill, H., and Schwartz, R.H. (1987). Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol* 138, 3704-3712.
- Rimland, J., Xin, W., Sweetnam, P., Saijoh, K., Nestler, E.J., and Duman, R.S. (1991). Sequence and expression of a neuropeptide Y receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 40, 869-875.
- Romagnani, S. (1994). Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol* 6, 838-846.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- Sanmun, D., Garwicz, D., Smith, C.I., Palmblad, J., and Fadeel, B. (2006). Stromal-derived factor-1 abolishes constitutive apoptosis of WHIM syndrome

- neutrophils harbouring a truncating CXCR4 mutation. *Br J Haematol* 134, 640-644.
- Santana, M.A., and Rosenstein, Y. (2003). What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol* 195, 392-401.
- Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., and Goeddel, D.V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669-671.
- Scimone, M.L., Felbinger, T.W., Mazo, I.B., Stein, J.V., Von Andrian, U.H., and Weninger, W. (2004). CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 199, 1113-1120.
- Singer, A., Bosselut, R., and Bhandoola, A. (1999). Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms. *Semin Immunol* 11, 273-281.
- Sloan-Lancaster, J., Evavold, B.D., and Allen, P.M. (1993). Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 363, 156-159.
- Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T.H., and Allen, P.M. (1996). Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands. *J Exp Med* 184, 1525-1530.
- Soriano, S.F., Serrano, A., Hernanz-Falcon, P., Martin de Ana, A., Monterrubio, M., Martinez, C., Rodriguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2003). Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. *Eur J Immunol* 33, 1328-1333.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2005). Regulation of mature T cell homeostasis. *Semin Immunol* 17, 183-191.
- Suzuki, Y., Rahman, M., and Mitsuya, H. (2001). Diverse transcriptional response of CD4(+) T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4(+) T cells. *J Immunol* 167, 3064-3073.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T., and Nagasawa, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.
- Tanabe, S., Heesen, M., Yoshizawa, I., Berman, M.A., Luo, Y., Bleul, C.C., Springer, T.A., Okuda, K., Gerard, N., and Dorf, M.E. (1997). Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J Immunol* 159, 905-911.
- Taniuchi, S., Masuda, M., Fujii, Y., Izawa, K., Kanegane, H., and Kobayashi, Y. (2005). The role of a mutation of the CXCR4 gene in WHIM syndrome. *Haematologica* 90, 1271-1272.
- Tarzi, M.D., Jenner, M., Hattotuwa, K., Faruqi, A.Z., Diaz, G.A., and Longhurst, H.J. (2005). Sporadic case of warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, and myelokathexis syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 116, 1101-1105.
- Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-603.
- Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., and Kelvin, D.J. (1993). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260, 355-358.

- Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., Lamy, L., Steinberg, M., Bernard, A., and Deckert, M. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 99, 3111-3118.
- Vicente-Manzanares, M., Cabrero, J.R., Rey, M., Perez-Martinez, M., Ursa, A., Itoh, K., and Sanchez-Madrid, F. (2002). A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis. *J Immunol* 168, 400-410.
- Vila-Coro, A.J., Rodriguez-Frade, J.M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M.C., Martinez, A.C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J* 13, 1699-1710.
- Wetzler, M., Talpaz, M., Kleinerman, E.S., King, A., Huh, Y.O., Gutterman, J.U., and Kurzrock, R. (1990). A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 89, 663-672.
- Williams, T.M., Moolten, D., Burlein, J., Romano, J., Bhaerman, R., Godillot, A., Mellon, M., Rauscher, F.J., 3rd, and Kant, J.A. (1991). Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science* 254, 1791-1794.
- Zang, M., Hayne, C., and Luo, Z. (2002). Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem* 277, 4395-4405.
- Zha, Y., Marks, R., Ho, A.W., Peterson, A.C., Janardhan, S., Brown, I., Praveen, K., Stang, S., Stone, J.C., and Gajewski, T.F. (2006). T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha. *Nat Immunol* 7, 1166-1173.
- Zinkernagel, R.M. (1996). Immunology taught by viruses. *Science* 271, 173-178.
- Zou, L., Barnett, B., Safah, H., Larussa, V.F., Evdemon-Hogan, M., Mottram, P., Wei, S., David, O., Curiel, T.J., and Zou, W. (2004). Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 64, 8451-8455.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.
- Zuelzer, W.W. (1964). "Myelokathexis"--a New Form of Chronic Granulocytopenia. Report of a Case. *N Engl J Med* 270, 699-704.

## Lebenslauf von Jan Adam

### Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 24.03.1977

Geburtsort: Malsch, Kreis Karlsruhe

Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung:

September 1983 - August 1987: Geschwister-Scholl-Grundschule, Ettlingen-Bruchhausen

September 1987 - August 1996: Eichendorff-Gymnasium, Ettlingen

### Zivildienst:

August 1996 - August 1997:

Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Universität Karlsruhe

Erworbene Kenntnisse: Nasschemische Analysen, AAS, AOX, CSB, UV/VIS-Spektroskopie

### Studium:

Oktober 1997 - 2002: Chemiestudium an der Universität Karlsruhe

Grundstudium:        Qualitatives Anorganisches Praktikum  
                          Quantitatives Anorganisches Praktikum  
                          Organikpraktikum 1  
                          A-Praktikum in Physikalischer Chemie  
                          Physikpraktikum

Vordiplom	Teil 1 (nach dem 3. Semester):	Anorganische Chemie Organische Chemie
	Teil 2 (nach dem 4. Semester):	Physikalische Chemie Physik

Hauptstudium: F-Praktikum in Anorganischer Chemie (inkl. Spektroskopiekurs)

Organikpraktikum 2 (inkl. Spektroskopiekurs)

F-Praktikum in Physikalischer Chemie

Wahlfachpraktikum in Biochemie

Vertieferpraktikum inkl. Anfertigen einer Vertieferarbeit in  
Biochemie

Zusätzliche Kenntnisse aus den Wahlvorlesungen:

Quantenmechanik)

Theorie der Chemischen Bindung

Grundlagen der NMR-Spektroskopie 1 und 2

Peptidmimetika

Naturstoffe und Nichtnaturstoffe

Supramolekulare Chemie

Diplomprüfungen

Teil 1 (Okt. 2001, nach dem 8. Semester):

Anorganische Chemie: Note 1,7

Physikalische Chemie: Note 1,3

Teil 2 (Jan. 2002):

Organische Chemie: Note 1,3

Biochemie: Note 1,3

Februar 2002 - Oktober 2002:

Diplomarbeit am Forschungszentrum Karlsruhe,

Institut für Toxikologie und Genetik;

Laborleiter und Betreuer: Prof. Dr. H. Ponta

Thema: „Kompetitive Hemmung der CD44-abhängigen c-Met-Signaltransduktion  
durch CD44-Peptide und Mutanten“

Januar 2003 - heute:

Beschäftigung als wiss. Mitarbeiter am ITG

Bis Dezember 2003: fortführende Arbeiten zur Diplomarbeit in der AG Ponta

Seit Januar 2004: Doktorarbeit in der AG Weg-Remers

**Sprachenkenntnisse:**

Englisch (fließend), Französisch (gut), Spanisch (fließend), Portugiesisch  
(Grundkenntnisse)