

Aus dem Fachgebiet
Molekulare Immunologie
des Robert Koch-Instituts
Berlin

DISSERTATION

Initiale Charakterisierung des humanen ATAC-Rezeptors,
eines neuen Sieben-Transmembran-Rezeptors

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Katrin Becher

aus Offenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Kroczek
 2. Prof. Dr. med. G.-R. Burmester
 3. Prof. Dr. med. Th. Dörner

Datum der Promotion: 07.12.2007

Meinen Eltern und meiner Großmutter in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	4
Verzeichnis der Abkürzungen.....	6
1. Einleitung	9
1.1. Einführung	9
1.2. Struktur der Chemokine, Einordnung von ATAC	10
1.3. Funktionen der Chemokine im allgemeinen und von ATAC im besonderen.....	12
1.4. Chemokinrezeptoren	15
1.4.1. hATAC-Rezeptor/XCR1/GPR5.....	17
1.4.2. Regulation der Chemokinrezeptorexpression	18
1.5. Problemstellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Herkunft der verwendeten Materialien und Chemikalien.....	20
2.1.1. Chemikalien.....	20
2.1.2. Sekundärreagenzien und Antiseren	20
2.1.3. Antikörper.....	21
2.2. Zellbiologische Arbeiten.....	22
2.2.1. Kryokonservierung von Zellen.....	22
2.2.2. Quantifizierung vitaler Zellen	22
2.2.3. Isolierung von humanen mononukleären Zellen durch Dichtegradienten- zentrifugation.....	23
2.2.4. Anreicherung von T-Zellen über Nylonwolle	23
2.2.5. Isolierung von Monozyten aus PBMCs durch Adhärenz	24
2.2.6. In vitro-Stimulation humaner Zellen	24
2.2.6.1. Stimulation mit PMA/Ionomycin.....	25
2.2.6.2. Stimulation mit PHA und IL-2.....	25
2.2.6.3. Stimulation von Monozyten mit LPS.....	25
2.2.7. Expression des hATAC-Rezeptors in eukaryontischen Zellen	26
2.2.7.1. Subklonierung von Transfektanten	27
2.2.7.2. Kultur von humanen ATAC-Rezeptor-Transfektanten.....	27
2.2.8. Herstellung eines ATAC-Rezeptor-spezifischen polyklonalen Anti- serums	27

2.2.9.	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen ATAC-Rezeptor.....	28
2.2.9.1.	Immunisierung.....	28
2.2.9.2.	Fusion mit Polyethylenglycol (PEG)	29
2.2.9.3.	Subklonierung und Kultivierung von Hybridomzellen	30
2.2.9.4.	Produktion von Hybridomkulturüberstand in größeren Mengen	30
2.2.9.5.	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberständen ..	31
2.2.9.6.	Bestimmung des Isotyps und Subtyps der monoklonalen Mausantikörper.....	32
2.2.10.	Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis monoklonaler Antikörper gegen das humane ATAC-Rezeptor-Protein	32
2.2.11.	Durchflusszytometrie.....	33
2.2.11.1.	Nachweis von Zelloberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie	34
2.2.11.2.	Nachweis von intrazellulären Antigenen mittels Durchflusszytometrie	35
2.2.11.3.	Durchflusszytometrische Analyse fluoreszenzmarkierter Zellen (Auswertung der Messdaten).....	36
2.2.11.4.	Diskriminierung toter Zellen mit Propidiumiodid (PI)	36
2.2.12.	Immunzytochemie	37
2.2.12.1.	Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten.....	37
2.2.12.2.	Herstellung von Gefrierschnitten	37
2.2.12.3.	Nachweis von Antigenen mittels APAAP-Technik	38
2.3.	Proteinchemische Methoden.....	40
2.3.1.	Immunpräzipitation	40
2.3.2.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	42
2.3.3.	Immunoblot-Analyse (Western Blot)	43
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Etablierung von Transfektanten, die den humanen ATAC-Rezeptor exprimieren	45
3.2.	Generierung monoklonaler Antikörper gegen den humanen ATAC-Rezeptor	48

3.2.1.	Charakterisierung der vier mAks 5C5, 6D2, 1F1, 7G11 sowie des Überstandes 6F8	51
3.2.1.1.	Durchflusszytometrische Analyse von allen vorhandenen hATACR-Transfektanten mit den mAks	51
3.2.1.2.	Vergleich der verschiedenen Transfektanten hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression mithilfe unterschiedlicher Methoden	53
3.2.1.2.1.	Immunpräzipitation des nativen hATACR-Proteins aus Lysaten der verschiedenen Transfektanten	55
3.2.1.2.2.	Immunzytochemischer Nachweis des hATACR-Proteins aus den verschiedenen Transfektanten	57
3.3.	Expression des humanen ATAC-Rezeptors in vivo	58
3.3.1.	Histologische Untersuchung von Gefrierschnitten verschiedener Gewebe mittels der APAAP-Methode.....	58
3.3.2.	Immunhistochemische Analyse von Zytozentrifugenpräparaten von primären Zellen.....	59
3.3.3.	Durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener primärer Zellen (NTCs, PBMCs, Monozyten)	59
3.3.4.	Immunpräzipitation von primären Zellen (NTCs, PBMCs, Monozyten)..	69
4.	Diskussion	70
4.1.	Generierung und Charakterisierung unterschiedlicher ATAC-Rezeptor-Transfektanten	71
4.2.	Etablierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den humanen ATAC-Rezeptor/XCR1	72
4.3.	Analyse des Expressionsmusters des hATAC-Rezeptors	75
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literatur	85
7.	Danksagung	97
8.	Lebenslauf	98
9.	Eidesstattliche Erklärung	100

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Der hATAC-Rezeptor mit c-myc Epitop am 3' bzw. 5'-Ende	45
Abb. 2	Durchflusszytometrische Bestimmung des Expressionsniveaus der unterschiedlichen hATAC-Rezeptor-Transfektanten	46
Abb. 3	Schwankungen im Expressionsniveau der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante	48
Abb. 4	Reaktivität der drei hATACR-Hybridomüberstände mit der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante	50
Abb. 5	Reaktivität der aufgereinigten hATACR-spezifischen mAks mit der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante	51
Abb. 6	Reaktivität der hATACR Transfektanten mit dem polyklonalen hATACR-spezifischen Maus-Immuns serum	54
Abb. 7	Immunoblot, der die Fähigkeit des mAks 6F8 zur Immunpräzipitation des nativen hATACR-Proteins und zur Detektion des denaturierten hATACR-Proteins zeigt.....	57
Abb. 8	Induktion der Rezeptorexpression auf humanen NTCs nach Stimulation mit PMA+Ionomycin	62
Abb. 9	Heraufregulation der hATACR-Expression auf PBMCs nach Stimulation mit PMA+Inomycin	63
Abb. 10	hATACR-Expression auf ruhenden und mit PHA stimulierten PBMCs	64
Abb. 11	hATACR-Expression auf ruhenden und mit PHA stimulierten NTCs.....	65
Abb. 12	Durchflusszytometrische Färbung von unstimulierten und PHA stimulierten PBMCs mit dem mAk 5C5 und elektronischer Eingrenzung auf Lymphozyten und Monozyten	65
Abb. 13	Ruhende PBMCs nach Anfärbung mit dem mAk 5C5 und durchflusszytometrischer Analyse. Elektronische Eingrenzung auf die Monozytenpopulation innerhalb der PBMCs	66
Abb. 14	Monozyten unstimuliert und nach 24h LPS-Stimulation, Immunfluoreszenzfärbung mit dem mAk 5C5	67
Abb. 15	Durchflusszytometrische Analyse von verschiedenen primären Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem polyklonalen hATACR-spezifischen Maus-Immuns serum (IS) bzw. mit dem Präimmuns serum (PIS).....	68

Tab. 1	Iso- und Subtypen der hATACR – spezifischen mAKs	50
Tab. 2	Durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Transfektanten und Wildtypzellen.....	53
Tab. 3	Vergleich der vier hATACR-Transfektanten hinsichtlich ihres Expressionsniveaus.....	55

Verzeichnis der Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ATAC	activation-induced T cell derived and chemokine related cytokine
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
AS	Aminosäure
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumine)
CD	Cluster of differentiation (Nomenklatur für Zelloberflächenantigene)
ConA	Concanavalin A
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
Fc	Fragment crystallizable
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzdetektor
g	Einheit der Zentrifugalbeschleunigung
GPCR	G-protein-coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
h	Stunde(n)
hATACR	humaner ATAC-Rezeptor
hu	human(es)
Iono	Ionomycin
IP	Immunpräzipitation
IL	Interleukin
IS	Immunsrum
kDa	Kilodalton
l	Liter

LPS	Lipopolysaccharid
Ltn	Lymphotactin
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mu	Maus-(murine)
MW	Molekulargewicht
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen (natural killer cells)
NTC	Nylon-T-Zellen (T-Zellen und NK-Zellen)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBMC	periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PHA	Phythämagglutinin
P+I	PMA+Ionomycin
PI	Propidiumiodid
PIS	Präimmunserum
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (reverse transcription-polymerase chain reaction)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec.	Sekunden
SPF	specific pathogen free
Tab.	Tabelle

TM	Transmembran
TMB	Tetramethylbenzidindihydrochlorid
TRAP	TNF-related activation protein
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (Unit)
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Einführung

Von entscheidender Bedeutung für die Abwehr von Krankheitserregern ist die Mobilität der Zellen des Immunsystems. Ein komplexes Signalnetzwerk ist erforderlich, um zu gewährleisten, dass die unterschiedlichen Zellen des Immunsystems zur richtigen Zeit an den richtigen Ort geleitet werden. Dieses Netzwerk wird im wesentlichen aus Zelloberflächenmolekülen und löslichen Botenstoffen, den Zytokinen (z.B. Chemokine, Interferone, Interleukine, Koloniestimulierende Faktoren, lösliche Zytokinrezeptoren) gebildet. Die Proteinfamilie der *Chemokine* spielt dabei eine Schlüsselrolle: Chemokine gelten als die wichtigsten Regulatoren für die Positionierung der unterschiedlichen Zellen des Immunsystems. Durch die komplexe Interaktion zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren wird die Migration von zahlreichen Zelltypen zwischen Blutbahn, Lymphgefäßsystem, Inflammationsorten sowie den sekundären lymphatischen Organen reguliert.

Darüber hinaus sind sie auch für homeostatische Funktionen des Immunsystems, wie beispielsweise für die Etablierung der komplexen Architektur der sekundären lymphatischen Organe und für die Zielortbestimmung („homing“) von Leukozyten essentiell notwendig (Butcher & Picker 1996; Cyster 1999; Baggiolini 2001; Kunkel & Butcher 2002).

Chemokine sind einerseits für die selektive Rekrutierung von Effektorzellen an den Infektionsherd verantwortlich – ein Prozess, der von wesentlicher Bedeutung für den Erfolg einer Immunantwort und damit für die Überwindung einer Infektion ist. Auf der anderen Seite können Chemokine jedoch auch für die fehlgesteuerte Rekrutierung von Leukozyten verantwortlich sein und dadurch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen spielen (z.B. rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Multiple Sklerose, allergische Erkrankungen wie Asthma, atopische Dermatitis) (Luster 1998; Homey & Zlotnik 1999; Gerard & Rollins 2001; Baggiolini 2001).

Die Chemokine besitzen darüber hinaus noch eine Vielzahl weiterer Funktionen, auf die noch näher eingegangen wird.

1.2. Struktur der Chemokine, Einordnung von ATAC

Die zur Gruppe der Zytokine gehörende Chemokin-Superfamilie stellt eine große Klasse von *chemotaktischen Zytokinen* dar mit mittlerweile mehr als 50 Vertretern. Chemokine sind strukturell verwandte (Homologie auf AS-Ebene 20-90%; Fernandez & Lolis 2002), kleine (Molekulargewicht 6-14 kDa bzw. 68-130 AS), sezernierte, basische, Heparin-bindende Proteine, zu deren wesentlichen Aufgaben die (chemotaktische) Anlockung von Zellen an den Ort einer inflammatorischen Reaktion gehört (Baggiolini et al. 1994).

Die Chemokine werden auf der Basis der Anzahl und Anordnung von konservierten Cysteinresten in vier Gruppen unterteilt: CXC-, CC-, CX₃C- und C-Familie (Rollins 1997; Zlotnik & Yoshie 2000). Die CXC- und die CC-Chemokine, also die beiden Hauptgruppen, sowie das Fractalkine als einziger Vertreter der CX₃C-Chemokine, besitzen jeweils vier konservierte Cysteinreste, die zwei essentielle Disulfidbrücken ausbilden (Cys1-Cys3 und Cys2-Cys4), wobei bei den CXC-Chemokinen die beiden Cysteinreste durch eine nicht konservierte AS voneinander getrennt sind, während sie bei den CC-Chemokinen direkt benachbart liegen. Das strukturell ungewöhnliche Chemokin Fractalkine/Neurotactin weist nur an seinem Aminoterminus Ähnlichkeit zu den klassischen Chemokinen auf. Es kann als einziges der bislang bekannten Chemokine membrangebunden vorliegen und besitzt neben einer chemokinähnlichen Region eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Region sowie eine mucinähnliche Domäne. Da die ersten beiden Cysteine durch drei AS getrennt sind und weil es strukturelle Besonderheiten aufweist, bildet Fractalkine den ersten und bislang einzigen Vertreter einer neuen Subklasse (CX₃C-Familie) (Bazan et al. 1997; Pan et al. 1997; Rossi et al. 1998).

Als bislang einziges Mitglied der C-Chemokine wurde **ATAC** (Activation-induced, T cell derived And Chemokine related cytokine) 1995 sowohl in unserer Arbeitsgruppe (Müller et al. 1995) als auch zeitgleich und unabhängig von mehreren anderen Gruppen im murinen (Kelner et al. 1994; muLtn) und im humanen System als Lymphotactin (Kennedy et al. 1995; huLtn) bzw. als SCM-1 (single cysteine motif-1) (Yoshida et al. 1995) identifiziert. ATAC ist ein sezerniertes, aus 114 AS bestehendes Protein mit einem MG von ca. 12,52 kDa, das aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten in die Superfamilie der Chemokine eingeordnet wird (Homologie zu den CC-Chemokinen auf AS Ebene 33-37% bzw. zu den CXC-Chemokinen 25-27% [Müller et al. 1995]). ATAC enthält jedoch nur das zweite und vierte von den insgesamt vier konservierten Cysteinen, so dass die Tertiärstruktur des Moleküls lediglich durch eine einzige Disulfidbrücke (Cys32 und Cys69) stabilisiert wird (Dorner et al. 1997), im Gegensatz zu den sonst für Chemokine typischen zwei Disulfidbrücken.

Aufgrund dieser strukturellen Besonderheiten, die eine Zuordnung weder zur CC- noch zur CXC-Familie ermöglichen, bildet ATAC innerhalb der Superfamilie der Chemokine eine eigene Untergruppe, die C-Familie. ATAC ist bislang der einzige Vertreter dieser neuen Chemokin-Subklasse. Die *funktionelle* Einordnung von ATAC in die Chemokinfamilie ist allerdings umstritten – die Zuordnung erfolgt lediglich aufgrund *struktureller* Ähnlichkeiten: Die initial publizierten Daten zur chemotaktischen Wirkung von ATAC auf T-Zellen konnten in der Folge durch unsere Arbeitsgruppe und eine Reihe anderer Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden, die exakte Funktion ist immer noch unklar (Bleul et al. 1996; Dorner et al. 1997; Yoshida et al. 1998).

Eine Vielzahl von Zellen, nicht nur des Immunsystems, ist in der Lage, Chemokine zu produzieren, wobei die meisten Chemokine jeweils von mehreren unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert und sezerniert werden. Im Gegensatz dazu weist ATAC ein sehr spezifisches Expressionsspektrum auf: ATAC wird sowohl im murinen als auch im humanen System hauptsächlich von aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten sowie aktivierten NK-Zellen synthetisiert und sezerniert (Kelner et al. 1994; Kennedy et al. 1995; Hedrick et al. 1997; Müller 1998). Außerdem wurde eine Expression in einer kleinen Subpopulation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen (Kennedy et al. 1995; Müller 1998), murinen (aktivierten) intestinalen intraepithelialen γ/δ T-Zellen (Boismenu et al. 1996) und in aktivierten Mastzellen (Rumsaeng et al. 1997) gezeigt. Darüber hinaus wird ATAC von murinen aktivierten CD4⁺ NK1.1⁺ T-Zellen (Kelner et al. 1994) sezerniert. Keine Expression konnte in ruhenden T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Fibroblasten oder in mit PMA oder Calcium-Ionophore stimulierten Zellen gefunden werden (Müller et al. 1995).

ATAC wird im humanen System vor allem in lymphatischen Geweben wie Milz, Thymus und PBMCs exprimiert, während die Expression in Lunge, Ovarien, Testis, Kolon und Dünndarm zwar detektierbar, aber deutlich niedriger als in den lymphatischen Organen ist (Yoshida et al. 1995). Im murinen System ist die Expression auf Milz und Thymus beschränkt (Kelner et al. 1994). Die ATAC-mRNA ist sehr schnell (30 min.) nach Aktivierung mit den Mitogenen PMA und Ionomycin nachweisbar, wobei ein Maximum nach 4 h erreicht wird (ein Signal ist noch bei 48 h nachweisbar) (Müller et al. 1995). Die Untersuchungen von Dorner (1997) konnten zeigen, dass es sich bei ATAC um ein lösliches Molekül handelt, das innerhalb von 30-40 min. nach seiner Synthese durch CD8⁺ T-Zellen in drei Proteinformen sezerniert wird: 60% werden in unmodifizierter, kationischer Form von 93 AS sezerniert, während ca. 40% in zwei verschiedenen, O-glykosylierten Formen mit einem apparenten MG von 15 und 17-19 kDa sezerniert werden.

In CD8⁺ T-Zellen führte eine Kreuzvernetzung des T-Zellrezeptors durch anti-CD3 mAk zur ATAC Sekretion. Durch eine Kostimulation durch anti-CD3 und anti-CD28 mAk wird die ATAC Sekretion noch weiter verstärkt (Müller 1998). ATAC gehört zu den sogenannten 2-Signalgenen, für die neben ihrer Induzierbarkeit durch PMA und Ionomycin eine Inhibition durch CyclosporinA charakteristisch ist. Die Induktion des ATAC-Gens ist unabhängig von einer de novo Proteinsynthese (Müller et al. 1995)

Die Identität zwischen dem mu und huATAC-Molekül beträgt auf AS-Ebene 61% und ist damit ungewöhnlich niedrig (Müller et al. 1995).

1.3. Funktionen der Chemokine im allgemeinen und von ATAC im besonderen

Chemokine spielen nicht nur bei der Rekrutierung von Effektorzellen an den Ort einer inflammatorischen Reaktion eine Rolle, sondern sind auch – wie bereits erwähnt – von entscheidender Bedeutung für die physiologische Migration von Leukozyten in die verschiedenen Subkompartimente der lymphatischen Organe und somit für homeostatische Funktionen des Immunsystems (Cyster 1999). Die Chemokinfamilie kann daher nicht nur anhand struktureller Eigenschaften, sondern auch anhand funktioneller Charakteristika unterteilt werden in die Gruppe der *inflammatorischen* oder *induzierbaren* Chemokine, die durch pro-inflammatorische Stimuli wie TNF, IL-1, IFN- γ , virale Infektionen oder das E.coli-Endotoxin LPS induziert werden, sowie in die Gruppe der *homeostatischen* oder *konstitutiven* Chemokine (z.B. SDF-1, MDC, HCC-1), die sogenannte „Housekeeping“-Funktionen erfüllen und die konstitutiv in lymphatischen Organen exprimiert werden und zusammen mit ihren Rezeptoren eine Rolle bei der Etablierung der komplexen Architektur der sekundären lymphatischen Organe spielen. Aufgrund der Aktivierungsabhängigkeit gehört ATAC am ehesten in die Gruppe der inflammatorischen Chemokine (Förster et al. 1996; Baggiolini 1998; Zlotnik & Yoshie 2000; Moser & Loetscher 2001). Die Wirkungsweise der Chemokine ist pleiotrop und redundant zugleich, d.h. die meisten Chemokine lösen in vitro unterschiedliche funktionelle Effekte einer Zielzelle aus, während ein bestimmter Effekt auf der anderen Seite durch verschiedene Chemokine erzielt werden kann (Baggiolini 1994).

Die *biologischen Wirkungen* der Chemokine sind äußerst vielfältig und nicht nur auf die chemotaktische Anlockung von Zellen beschränkt: Zu den Funktionen der Chemokine gehören die T-Zell-Kostimulation, Regulation von Adhäsionsmolekülen, Leukozyten-Aktivierung, Zytokin-Expression, T-Zell-Differenzierung, Freisetzung von Histamin oder anderen

Entzündungsmediatoren aus Basophilen und Eosinophilen, Exozytose von Proteasen und anderen Enzymen aus den intrazellulären Speichergranula der Neutrophilen, Schutz vor Apoptose, Förderung von Proliferation, Immunglobulinproduktion, Produktion von Sauerstoffradikalen (Generierung der respiratorischen Entladung) und bioaktiven Lipiden, Calcium-Einstrom und Zell-Polarisation (Baggiolini et al. 1994; Ben-Baruch et al. 1995; Taub et al. 1996; Newton et al. 1997; Baggiolini 1998). In NK-Zellen führen Chemokine zu einer Freisetzung enzymhaltiger Granula und zu einer Steigerung der Zytotoxizität und Proliferation (Taub et al. 1995; Loetscher et al. 1996; Maghazachi et al. 1996).

Chemokine können die verstärkte Expression und Aktivierung von Integrinen induzieren, wodurch es der Zelle ermöglicht wird, sich an Endothelzellen der Gefäßwände anzuheften, um dann durch die Gefäßwand hindurch in das umliegende Gewebe zu wandern. Hierbei können drei aufeinanderfolgende Schritte unterschieden werden: transiente Adhäsion, aktivierungsabhängige Adhäsion und Transmigration (Springer 1994; Butcher & Picker 1996). Außerdem spielen sie bei der Angiogenese (sowohl Stimulation als auch Inhibition), der Kollagenproduktion und der Proliferation und Mobilisation von hämatopoietischen Vorläuferzellen eine Rolle. In einigen nicht-leukozytären Zellpopulationen (Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen, Keratinozyten und Melanozyten) induzieren Chemokine die Proliferation und Migration (Baggiolini 1994; Rollins 1997; Olson & Ley 2002).

Eine Reihe von Publikationen zeigte, dass Chemokine und ihre Rezeptoren neben ihren vielfältigen anderen Funktionen auch an der Regulation der HIV-Infektion beteiligt sind (Berger et al. 1999): die CC-Chemokine RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β sind in der Lage, die Vermehrung des HIV zu inhibieren (Cocchi et al. 1995). Feng und Kollegen konnten 1996 zeigen, dass für die HIV-Infektion einer Zelle außer dem CD4-Molekül noch der Chemokinrezeptor CXCR4 als Korezeptor erforderlich ist. Ungefähr zeitgleich wurde von mehreren Gruppen demonstriert, dass CCR5 als Korezeptor für Makrophagen-trope HIV-1 Stämme dient (Deng et al. 1996; Choe et al. 1996; Doranz et al. 1996; Alkhatib et al. 1996). Die Zahl der HIV-Korezeptoren ist in der Zwischenzeit schnell angewachsen und umfasst mittlerweile 15 Chemokinrezeptoren und verwandte 7TMR. Die genauen Mechanismen, durch den die Chemokine ihren HIV-1-inhibitorischen Effekt ausüben, sind komplex und noch nicht vollständig geklärt.

Die **Funktion von ATAC** ist im Gegensatz zum Expressionsmuster noch immer nicht gut definiert und die funktionelle Einordnung von ATAC in die Familie der Chemokine noch immer umstritten, da die bislang publizierten Daten zur chemotaktischen Wirkung von ATAC auf T-Zellen widersprüchliche Ergebnisse zeigen. Es konnte von Dorner et al. in keiner der

untersuchten Zellpopulationen (primäre Lymphozyten gesamt, CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, T-Zell-Klone, Monozyten) eine chemotaktische Aktivität von ATAC nachgewiesen werden, wodurch sich das ATAC-Molekül funktionell von den anderen Chemokinen unterscheidet. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass natives ATAC in der Lage ist, die Chemokinese (ungerichtete Bewegung, im Gegensatz zur Chemotaxis, der zielgerichteten Bewegung von Zellen entlang des Konzentrationsgradienten eines löslichen Mediators) von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu induzieren (Dorner et al. 1997). Bleul (Bleul et al. 1996) und Yoshida (Yoshida et al. 1998) konnten ebenfalls keine chemotaktische Aktivität von ATAC auf primäre humane T-Zellen nachweisen. Ein Teil der publizierten Experimente steht im Widerspruch zu diesen Ergebnissen, was möglicherweise auf unterschiedliche experimentelle Bedingungen zurückzuführen ist: Kelner et al. (1994) publizierten im murinen System eine chemotaktische Aktivität von muLtn auf CD8⁺-Zellen sowie auf CD4⁺ T-Zellen. Kennedy und Kollegen (1995) konnten im humanen System in Anwesenheit von huLtn ebenfalls Chemotaxis, nicht jedoch Chemokinese von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachweisen. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde außerdem im humanen und murinen System eine chemotaktische Aktivität von ATAC/muLtn auf NK-Zellen publiziert (Bianchi et al. 1996; Giancarlo et al. 1996; Hedrick et al. 1997). Huang et al. (2001) beschrieben darüber hinaus eine chemotaktische Wirkung von muLtn auf B-Lymphozyten und dosisabhängig auch auf Neutrophile (neben der chemotaktischen Wirkung auf T-Zellen).

Aufgrund der spezifischen Eigenschaften von ATAC (schnelle Expressionskinetik, spezifisches Expressionsmuster [Produktion durch NK-Zellen, Mastzellen, intraepitheliale $\gamma\delta$ -Zellen, CD8⁺ T-Zellen]) kann die Hypothese aufgestellt werden, dass ATAC in der frühen Phase der Immunantwort sowie bei der Tumorbekämpfung eine Rolle spielt (Hedrick & Zlotnik 1998), worauf auch die bislang publizierten Ergebnisse hindeuten:

Durch mehrere Experimente im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ATAC als ein immunologisches Adjuvans fungieren kann, das die Tumorbekämpfung unterstützt, möglicherweise über eine CD8⁺ T-Zell-vermittelte zytotoxische Aktivität sowie eine CD4⁺ T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion. Dilloo et al. (1996) konnten in einem Tumormodell der Maus eine Inhibition des Tumorwachstums durch ATAC und IL-2 demonstrieren: Durch die Kotransfektion von ATAC und IL-2 (zusammen mit nicht-immunogenen Tumorzellen) in syngene Mäuse konnte das Tumorwachstum signifikant verzögert werden (im Vergleich zum Transfer von ATAC oder IL-2 alleine) und ein protektiver Effekt bei einem bereits bestehenden Tumor erzielt werden. Durch histologische Untersuchungen des Tumordinfiltrates und Zell-

Depletionsstudien konnte gezeigt werden, dass für den protektiven Effekt sowohl CD8⁺ T-Zellen als auch CD4⁺ T-Zellen notwendig sind.

Inzwischen konnte bereits in mehreren Gentransfer-Experimenten im murinen System der inhibierende Effekt von ATAC auf das Tumorwachstum bestätigt werden bzw. gezeigt werden, dass ein intratumoraler ATAC-Gentransfer in der Lage ist, die therapeutische Effizienz einer Immuntherapie (z.B. adoptive T-Zell-Therapie) von malignen Tumoren zu verbessern (Cao et al. 1998; Zhang et al. 1999; Cairns et al. 2001; Wang et al. 2002; Huang et al. 2002; Xia et al. 2002; Rousseau et al. 2003).

ATAC scheint außerdem in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine Rolle zu spielen. So konnte beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis, beim M. Crohn oder bei der IgA-Nephropathie eine vermehrte ATAC-Expression im Vergleich zu gesunden Geweben nachgewiesen werden (Middel et al. 2001; Ou et al. 2002; Blaschke et al. 2003).

1.4. Chemokinrezeptoren

Genau wie alle Chemokine eine ähnliche Struktur besitzen, sind auch die Rezeptoren einander sehr ähnlich. Alle bislang identifizierten 19 Chemokinrezeptoren gehören zur Superfamilie der Siebentransmembran-Rezeptoren (7TMR), die mit heterotrimeren GTP-bindenden G-Proteinen interagieren. Diese Rezeptorfamilie umfasst eine große Anzahl strukturell verwandter, funktionell sehr diverser, Pertussistoxin-sensitiver, G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, zu denen beispielsweise das Rhodopsin, die adrenergen Rezeptoren, Histamin-Rezeptoren, Dopamin-Rezeptoren sowie Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Hormone gehören. Alle Rezeptoren sind Glykoproteine mit einer einzelnen Polypeptidkette, die in die Lipid-Doppelschicht der Zelloberfläche eingebettet und nach einem gemeinsamen Strukturprinzip aufgebaut sind: charakteristisch sind sieben hydrophobe Bereiche aus 19-24 AS, die Transmembran-alpha-Helices bilden und die durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen (je ca. 12-14 AS) verbunden sind. Die Rezeptoren weisen eine extrazelluläre aminotermine Domäne, die häufig glykosyliert ist sowie einen zytoplasmatischen Carboxyterminus auf. Die extrazelluläre Domäne besteht somit aus dem N-Terminus und drei extrazellulären Schleifen, die gemeinsam als Bindungsstelle für den Liganden dienen. Die intrazelluläre Region setzt sich aus drei Schleifen und dem C-Terminus zusammen, die zusammen die Signaltransduktion bewirken (Gudermann et al. 1995; Sallusto et al. 2000; Murphy et al. 2000; Horuk 2001; Olson & Ley 2002;). Alle Chemokinrezeptoren bestehen aus ca. 340-370 AS mit einer Übereinstimmung auf AS-Ebene

zwischen 25-80% (Murphy et al. 2000) und besitzen ein MG von ca. 40 kDa (Mellado et al. 2001).

Weitere strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den Chemokinrezeptoren beinhalten (1) einen azidischen NH₂-Terminus, (2) eine konservierte Sequenz (die Sequenz DRYLAI oder eine Variation davon) in der zweiten intrazellulären Schleife, die gemeinsam mit anderen intrazellulären Domänen eine Rolle bei der Interaktion mit den G-Proteinen sowie bei der Signalauslösung spielen soll, (3) eine kurze basische dritte intrazelluläre Schleife und (4) Cysteinreste in jeder der vier extrazellulären Domänen und im N-Terminus, die über die Bildung von Disulfidbrücken die Konformation des Rezeptors zu stabilisieren scheinen. Konservierte Strukturen finden sich außerdem in der siebten TM-Region und in der dritten TM-Region, von der man weiß, dass sie für die Signaltransduktion essentiell ist sowie in der zweiten und dritten intrazellulären Schleife. Die sieben, sich durch die Membran windenden Domänen sind hochkonserviert zwischen den Chemokinrezeptoren und auch zwischen Chemokinrezeptoren und anderen 7TM, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Chemokinrezeptoren haben außerdem im Vergleich zu anderen 7TMR einen relativ kurzen zytoplasmatischen Carboxyterminus (40-50 AS), der neben einer Anzahl von Serin- und Threoninresten, die phosphoryliert sein können, typischerweise Sequenzen enthält, die für die Interaktion mit G-Proteinen notwendig sind (neben der zweiten und dritten intrazellulären Schleife) (Gudermann et al. 1995; Murphy et al. 2000).

Chemokinrezeptoren besitzen sehr komplexe Bindungsstellen für den Liganden, die sich aus mehreren Domänen und mindestens zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammensetzen: eine für das Andocken des Liganden und die andere für die Auslösung der funktionellen Aktivität (Murphy et al. 2000).

Die Aktivierung des Rezeptors stellt man sich mit einem Zwei-Schritt-Modell vor: Im ersten Schritt kommt es zur spezifischen Erkennung des Chemokin-Agonisten und zur Bindung des Rezeptors. Dies ist gefolgt von einer Konformationsänderung, die es dem N-Terminus des Chemokins erlaubt, die notwendige Interaktion mit dem Rezeptor, die dann zur Aktivierung des Rezeptors führt, durchzuführen (Fernandez & Lolis 2002). Der N-Terminus weist eine hohe Variabilität auf und scheint eine wichtige Rolle für die Determinierung der Liganden-Spezifität zu spielen. Daneben wird auch der dritten extrazellulären Domäne eine Bedeutung für die Liganden-Bindung zugeschrieben (Premack & Schall 1996).

Die Interaktion der Chemokine mit ihren Rezeptoren ist überaus komplex, da die meisten der bekannten Rezeptoren mit mehreren Chemokinliganden interagieren (bei jedoch stetig wachsender Zahl der monospezifischen Rezeptoren) und die meisten Chemokine mit mehr als nur einem Rezeptor reagieren (Promiskuität). Da ein bestimmter Rezeptor immer nur mit

Chemokinen derselben Subfamilie interagiert (abgesehen vom Duffy-Antigen, das sowohl CC- als auch CXC-Chemokine bindet) erfolgt die Einteilung der Chemokinrezeptoren auf der Grundlage ihrer jeweiligen Ligandenspezifität in CC-, CXC-, C- und CX₃C-Chemokinrezeptoren (CXCR1 bis 6; CCR1 bis 11; XCR1 und CX₃CR1), auch wenn keine strukturellen Unterschiede identifiziert werden konnten, die die Rezeptor-Subfamilien voneinander unterscheiden (Murphy et al. 2000).

Die Bindungsaffinität der Chemokine zu ihren Rezeptoren beträgt zwischen $K_d = 500$ pM und 10 nM (McFadden & Kelvin 1997) bei einer Chemokinrezeptor-Dichte auf T-Zellen von ca. 1000-4000 pro T-Zelle (Mackay 1996). Chemokinrezeptoren können nicht nur von Leukozyten exprimiert werden, sondern auch von anderen Zelltypen wie beispielsweise Endothelzellen, Neuronen, Epithelzellen und Mikrogliazellen (Murphy et al. 2000).

Bei der Analyse der Chemokinrezeptoren ist zu beachten, dass die Chemokinrezeptorexpression auf der Zelloberfläche als höchst variabel gilt: das bedeutet, dass der Nachweis von mRNA nicht unweigerlich mit einer funktionellen Rezeptorexpression korrespondiert, sondern auch mit einem internen Pool korrelieren kann (Mellado et al. 2001). Posttranslationale Modifikationen können die Rezeptoraktivität beeinflussen (Fernandez & Lolis 2002).

1.4.1. hATAC-Rezeptor/XCR1/GPR5

Der Rezeptor GPR5 (Heiber et al. 1995) wurde 1998 von Yoshida et al. als ATAC-spezifischer Rezeptor identifiziert und nach der systematischen Nomenklatur als **XCR1** bezeichnet. 1999 gelang es, auch einen monospezifischen Rezeptor für das murine SCM-1/Lymphotactin zu charakterisieren (muXCR1; Yoshida et al. 1999). Die Homologie auf AS-Ebene zwischen dem murinen und humanen XCR1 beträgt 71% (Yoshida et al. 1999). Neben ATAC wurde das virale Chemokin-Homolog vMIP II als einziger weiterer Ligand (mit antagonistischer Wirkung) beschrieben (Shan et al. 2000). Der Rezeptor besitzt 20-40% Sequenzhomologie zu anderen Chemokinrezeptoren; das kodierende Gen ist auf dem Chromosom 3p21.3-3p21.1 lokalisiert und damit den CC-Chemokinrezeptor-Genen nahe benachbart (die auf dem Chromosomen 3p21 lokalisiert sind), zu denen auch die größte Verwandtschaft besteht. Das DRYLAIV-Motiv in der zweiten intrazellulären Domäne, das innerhalb anderer Chemokinrezeptoren hochkonserviert ist und das am G-Protein Andocken beteiligt ist, ist sowohl beim muXCR1 als auch beim huXCR1 verändert zu HRYLSVV (Yoshida et al. 1999).

Über das Expressionsmuster des Rezeptors ist noch wenig bekannt.

1.4.2. Regulation der Chemokinrezeptorexpression

Auf Lymphozyten und anderen Zellen des Immunsystems können die Chemokinrezeptoren zum Teil erst nach entsprechender Aktivierung nachgewiesen werden (Baggiolini et al. 1994; Bacon & Schall 1996; Loetscher et al. 1996; Mackay 1996; Bleul et al. 1997). Neben der *Produktion* von Chemokinen spielt somit die *Regulation der Chemokinrezeptorexpression* eine ebenso entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Chemokinsystems.

T-Lymphozyten und DCs durchlaufen während ihrer Entwicklung und Differenzierung oder Aktivierung eine hochdynamische Regulation ihrer Chemokinrezeptorexpression, was es ihnen erlaubt, ihre Umgebung zu verlassen und in unterschiedliche Regionen zu wandern, in denen sie mit anderen Zellen interagieren (Sallusto et al. 1998). Durch das spezifische Muster der Chemokinrezeptorexpression kann somit die Qualität und das Ausmaß einer Immunantwort mitbestimmt werden. Naive T-Zellen z.B. regulieren nach Aktivierung und Differenzierung zu Gedächtnis/Effektorzellen Rezeptoren für konstitutive Chemokine wie CXCR4 und CCR7 herunter, während die Expression von inflammatorischen Rezeptoren induziert wird (CCR3, CCR5, CXCR3). Eine Th1-Differenzierung ist mit der Expression von CXCR3 und CCR5 assoziiert, während Th2-Zellen bevorzugt CCR3, CCR4 und CCR8 exprimieren. CXCR4 und CCR2 werden von beiden Subpopulationen gleichermaßen exprimiert. Manche Rezeptoren wie z.B. CXCR3 werden ausschließlich von aktivierten T-Zellen exprimiert, während andere (z.B. CXCR4, CCR7) hauptsächlich von naiven CD45RA⁺ T-Zellen exprimiert werden. CCR5 wiederum wird im wesentlichen von CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. Die Expression von vielen Rezeptoren (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR3, CXCR4, CX3CR1) wird nach mitogener Stimulation und/oder durch IL-2 heraufreguliert, während durch anti-CD3 und/oder anti-CD28 einige dieser Rezeptoren herunterreguliert werden (Sallusto et al. 1998; Bonecchi et al. 1998; Ward et al. 1998; Kim & Broxmeyer 1999).

Auch die Reifung von DCs nach Antigenkontakt ist mit einem Wechsel der Expression von inflammatorischen Rezeptoren (CCR1,2,5,6 und CXCR1) zu homeostatischen Rezeptoren (CCR7, CCR4, CXCR4) assoziiert. Durch diese Veränderungen im Expressionsmuster wird sichergestellt, dass unreife DCs an Inflammationsorte gelangen, wo sie Antigenkontakt bekommen sowie nach der Reifung zur Stimulation von T-Zellen zurück in die Lymphknoten geleitet werden (Sallusto et al. 1998).

Mechanismen, durch die die Rezeptorexpression reguliert werden kann, beinhalten intrazelluläre Chemokinrezeptor-Speicher, die die rasche Heraufregulation in Antwort auf eine Aktivierung

erlauben, die Rezeptor-Endozytose nach Bindung des Liganden sowie Regulation auf der Ebene der Genexpression und Translation.

1.5. Problemstellung

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung eines neuen 7TM Rezeptors, des XCR1/GPR5, der 1998 als ATAC-spezifischer Rezeptor identifiziert wurde. Über die Funktion des Chemokinliganden ATAC ist bislang nur wenig bekannt.

Über die Analyse des Expressionsmusters des hATACR/XCR1/GPR5 und damit der Definition der Zielzellen von ATAC sollte die biologische Aktivität von ATAC näher charakterisiert werden.

1. Etablierung von hATAC-Rezeptor-spezifischen Transfektanten

Generierung von Transfektanten, die als Hilfsmittel zur Bestimmung der mAk-Spezifität dienen sollten.

2. Generierung von hATAC-Rezeptor-spezifischen mAks

Zur Analyse der Rezeptorexpression sollte ein monoklonaler hATACR-spezifischer Antikörper generiert und charakterisiert werden.

3. Charakterisierung des hATAC-Rezeptors

Mit Hilfe des mAks sollten Zellpopulationen, die den Rezeptor exprimieren, identifiziert werden. Hierbei sollten verschiedene Techniken angewandt werden (Durchflusszytometrie, Immunhistochemie, Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse). Außerdem sollten die Expressionskinetik und die Induktionsbedingungen des Rezeptors analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Herkunft der verwendeten Materialien und Chemikalien

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Biorad (München)
Avidx	Tropix (Bedford, Mass., USA)
Blutpräparate (buffy coats)	Blutbank Krankenhaus Moabit
BSA	Serva (Heidelberg)
CDP-Star	Tropix (Bedford, Mass., USA)
Coomassie Brilliant Blue	BioRad (München)
Endobulin	Immuno (Heidelberg)
FCS	Biochrom (Berlin)
Ficoll	Biochrom (Berlin)
G418 (Geneticin)	GibcoBRL (Gaithersburg, Md., USA)
Interleukin-2 (IL-2)	Sandoz, Basel
Ionomycin	Sigma (Deisenhofen)
Mikrotiterplatten für ELISA	Nunc (Roskilde, DK)
Natriumazid	Serva (Heidelberg)
Penicillin, Streptomycin	GibcoBRL (Gaithersburg, Md., USA)
Phythämagglutinin (PHA)	Sigma (Deisenhofen)
PMA	Sigma (Deisenhofen)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Pharmacia/LKB (Freiburg)
Röntgenfilme XOMatAR, BiomaxMS	Kodak (New York, USA)
RPMI 1640	Biochrom (Berlin)
Saponin	Sigma (Deisenhofen)
SDS	BioRad (München)
Trypanblau	Serva, Heidelberg

2.1.2. Sekundärreagenzien und Antisera

Kaninchenantiserum anti hATACR	Aus unserem Labor (Dr. B. Dorner)
--------------------------------	-----------------------------------

Kaninchen anti-Maus Ig Fraktion	Sigma (Deisenhofen)
Ziege anti-Maus IgG, FITC-konjugiert	Caltag (San Francisco, USA)
Ziege anti-Maus F(ab') ₂ -Fragmente, FITC konjugiert	Jackson Immuno Research Lab., USA

2.1.3. Antikörper

Spezifität	Markierung	Isotyp	Klon	Herkunft
CD1a	-		MCA 650	Hybridom?
CD3	FITC	IgG1	UCHT1	Serotec, England
CD3	PE	IgG1	UCHT1	Pharmingen, Hamburg
CD3	-	IgG2a	OKT3	Hybridom, ATCC
CD4	FITC	IgG2a	SK3	Becton Dickinson, Heidelberg
CD4	PE	IgG2a	S3.5	Medac, Hamburg
CD4	-	IgG1	30F16H5	Hybridom, ATCC
CD8	FITC	IgG1	SK1	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8	PE	IgG1	B9.11	Immunotech, Hamburg
CD8	-	IgG2a	OKT8	Hybridom, ATCC
CD14	-	IgG1	63D3	Hybridom, ATCC
CD19	FITC	IgG1	4G7	Hybridom, ATCC
CD19	-	IgG1	BU12	Hybridom, ATCC
CD25	FITC	IgG2a	B1.49.9	Immunotech, Hamburg
CD25	-	IgG1	2A3A1H	Hybridom, ATCC
CD69	FITC	IgG1	FN50	Pharmingen, Hamburg
CD71	FITC	IgG1	5E9C11	Hybridom, ATCC
MHCII	PE	IgG2a	L243	Hybridom, ATCC
TRAP/CD40L	FITC	IgG1	TRAP-1	Hybridom
8F4	FITC	IgG1	8F4	Hybridom
Isotyp	-	IgG1	MOPC 21	Sigma, Deisenhofen
Isotyp	-	IgG1	2A11	Hybridom
Isotyp	FITC	IgG1	2A11	Hybridom
Isotyp	-	IgG1	3G11	Hybridom
Isotyp	PE	IgG1	3G11	Hybridom

Alle nicht aufgeführten Reagenzien wurden in p.a.-Qualität bei folgenden Firmen bestellt: Merck (Darmstadt); Roth (Karlsruhe); Sigma (Deisenhofen); Fluka (Buchs, CH); Serva (Heidelberg). Sterile Kulturgefäße für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc (Roskilde, DK), Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.2. Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten (bis auf 2.2.2.) wurden steril durchgeführt.

2.2.1. Kryokonservierung von Zellen

Die Zellsuspension wurde für ca. 30 min. bei 4°C in komplettem Medium inkubiert und abschließend zentrifugiert (350 g, 10 min., 4°C; Varifuge 3.2 RS Heraeus, Berlin). Das Zellpellet wurde in kaltem komplettem Medium resuspendiert und jeweils 70 µl der Zellsuspension und 70 µl Einfriermedium in ein 1,4 ml Einfrierröhrchen (Nunc, Roskilde, DK) überführt, auf -70°C heruntergekühlt und nach 24-48 h in einen Stickstoff Lagerbehälter gebracht. Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut. Der Auftauvorgang wurde so schnell wie möglich in einem 37°C warmen Wasserbad durchgeführt. Nach dem Auftauen wurde die DMSO-haltige Zellsuspension langsam unter Schütteln mit kaltem komplettem Zellkulturmedium 1:20 ausverdünnt und anschließend zentrifugiert (10 min., 350 g, 4°C). Das Zellpellet wurde in warmem komplettem Medium resuspendiert und die Vitalität der Zellen wurde bestimmt.

2.2.2. Quantifizierung vitaler Zellen

Die Bestimmung der Zahl und Vitalität von Zellen wurde mit dem Trypanblau-Test nach Freshney (1987) durchgeführt. Dazu wird ein Aliquot der Zellsuspension mit 0,001% (w/v) Trypanblau in PBS gemischt und in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Da sich nur die toten Zellen mit Trypanblau färben, können sie so von lebenden Zellen unterschieden werden.

2.2.3. Isolierung von humanen mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) durch Dichtegradientenzentrifugation über eine Ficoll-Trennlösung nach der Methode von Boyum (1964) und Ting et al. (1971) dienen „buffy coats“ (heparinisiertes Blutspendematernal nach Entzug eines Großteils des Plasmas). Für die Gewinnung eines „buffy coats“ werden 500 ml Vollblut eines gesunden Spenders zentrifugiert und anschließend die leukozytenreiche Bande zwischen Plasma und Erythrozyten (der sogenannte „buffy coat“) abgenommen.

Der buffy coat wurde 1:2 mit PBS verdünnt und jeweils 15 ml Ficoll-Lösung (Biochrom, Berlin) mit je 35 ml der Zellsuspension überschichtet. Da die Dichte von Ficoll mit 1,077 g/ml höher ist als die von Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten, können die mononukleären Zellen durch Zentrifugation (400 g, 25 min., 18°C, ohne Bremse) in der Grenzschicht zwischen Ficoll und PBS/Blutplasma angereichert werden, während sich die Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten am Boden absetzen. Diese als weißer Ring sichtbare Interphase wurde vorsichtig abgenommen und mit kalter PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (400 g, 18°C, 10 min.). Das so gewonnene Zellsediment wurde ein weiteres Mal mit 50 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (160 g, 10 min., 18°C), um die Thrombozyten möglichst weitgehend zu entfernen. Anschließend wurden die mononukleären Zellen in RPMI 1640/10% FCS Medium aufgenommen, ihre Zahl und Vitalität bestimmt und dann entweder sofort weiterverarbeitet oder eingefroren. Ein buffy coat enthielt ca. $6-8 \times 10^8$ mononukleäre Zellen.

2.2.4. Anreicherung von T-Zellen über Nylonwolle

Die Anreicherung der T-Zellen aus den PBMCs wurde nach der von Eisen et al. (1972) beschriebenen Methode durchgeführt: Auf eine mit PBS gespülte und mit 100 ml Medium äquilibrierte Nylonwollsäule werden maximal 5×10^8 PBMCs in 12 ml Medium gegeben (3 Gramm Nylonwolle in einer 50 ml Einwegspritze) und zur Anheftung der adhärennten Zellen 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dabei adhären B-Zellen und Monozyten an der Nylonwolle, während die nichtgebundenen T-Zellen und NK-Zellen nach 1 h mit 50 ml warmem Medium eluiert werden können und ihre Vitalität und Zahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt werden kann. Die Reinheit der Zellen betrug typischerweise 80-95% (durchflusszytometrisch bestimmt

anhand des prozentualen Anteils an CD3⁺-Zellen) bei einer Ausbeute von ca. 70% der eingesetzten Zellmenge.

2.2.5. Isolierung von Monozyten aus PBMCs durch Adhärenz

Zur Isolierung der Monozytenpopulation wurden zunächst PBMCs aus einem buffy coat aufgereinigt. Die Trennung der Monozyten von den Lymphozyten erfolgte durch Adhärenz an die Zellkulturflasche. Hierzu wurden die PBMCs (je 100-150x10⁶ PBMC in 40 ml R10F⁺) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ in einer 200 ml Zellkulturflasche (Greiner) inkubiert. Nach einer Stunde wurden durch sanftes Schütteln der Zellkulturflasche die nicht adhärenen (sowie die wenig adhärenen Zellen) vom Boden gelöst, das Medium mit den nicht-adhärenen Zellen abgesaugt und anschließend mehrmals der Boden der Zellkulturflasche mit Medium ab gespült, so dass der Großteil der nicht-adhärenen Zellen entfernt wurde. Die Zellkulturflasche wurde wieder mit 40 ml Medium gefüllt und bis zur Verwendung weiter im Brutschrank inkubiert.

Der Anteil an Monozyten in den PBMC-Adhärenz-Kulturen wurde durchflusszytometrisch anhand des Prozentsatzes an CD14⁺-Zellen an der Gesamtpopulation ermittelt und lag in der Regel zwischen 90 und 95% (genaue Prozentzahl von CD14⁺-Zellen ist bei den jeweiligen Experimenten angegeben). Die Ausbeute an Monozyten aus 100-150x10⁶ eingesetzten PBMCs betrug typischerweise ca. 10x10⁶ Zellen (nach 2-3 Tagen Inkubation).

Die Monozyten-angereicherten Kulturen wurden jeweils zur Hälfte mit LPS stimuliert und zur Hälfte ohne Stimulation belassen.

2.2.6. In vitro-Stimulation humaner Zellen

Die Inkubation der Zellen erfolgte in den Kavitäten von Flachboden-Mikrotiterplatten bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank. Die Inkubationszeiten für die jeweiligen Experimente sind im Ergebnisteil aufgeführt. Als Kulturmedium wurde für alle Stimulationen R10F⁺ verwendet.

2.2.6.1. Stimulation mit PMA/Ionomycin

Zur Stimulation hatten die Zellen eine Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen (NTCs oder PBMCs aus dem peripheren Blut) wurden mit PMA (Endkonzentration 33 ng/ml) und Ionomycin (Endkonzentration 200 ng/ml) in Kombination stimuliert. Um eine gute Lösung der hydrophoben Substanzen zu erzielen, wurden die Reagenzien unmittelbar vor ihrem Einsatz zunächst in einem kleinen Volumen RPMI 1640 ohne Serum (um eine Bindung der lipophilen Substanzen an FCS zu verhindern) gelöst, bevor sie der Zellsuspension zugegeben wurden. Die Inkubation der Zellen erfolgte in den Kavitäten von Flachboden-Mikrotiterplatten bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Feuchtbrutschrank. Nach der Stimulation wurden die Zellen entweder sofort durchflusszytometrisch analysiert bzw. zytozentrifugiert oder aber im Falle einer späteren Verwendung in der Immunpräzipitation abzentrifugiert (350 g, 10 min., 18°C) und das Zellsediment bei -70°C gelagert. Die maximale Stimulationsdauer betrug 48 h.

2.2.6.2. Stimulation mit PHA und IL-2

Zur Stimulation hatten die Zellen (PBMCs oder NTCs) eine Dichte von $1-2 \times 10^6$ /ml. Die erforderliche Endkonzentration des PHA P (Difco, Detroit, MI, USA) war in Vorexperimenten austitriert worden und betrug 1,25 µg/ml. Am dritten Tag wurde der Kultur jeweils 50 U/ml IL-2 zugegeben. Eine Restimulation mit PHA und IL-2 erfolgte nach 7 sowie nach 10 Tagen. Die maximale Stimulationsdauer betrug 14 Tage.

2.2.6.3. Stimulation von Monozyten mit LPS

Die Stimulation der Monozyten-angereicherten Kulturen erfolgte in Zellkulturflaschen (37°C, 5% CO₂), wobei die Zellen eine Dichte von 2×10^6 /ml hatten. Die Zellen wurden mit LPS in einer Endkonzentration von 1 µg/ml stimuliert.

2.2.7. Expression des hATAC-Rezeptors in eukaryontischen Zellen

Als Hilfsmittel für die Generierung und Charakterisierung des hATACR-spezifischen monoklonalen Antikörpers wurden verschiedene Transfektanten etabliert, die den hATACR überexprimieren. In den transfizierten Zelllinien ist das hATACR-Molekül am 3'- bzw. 5'-Ende jeweils mit einem c-myc Epitop fusioniert, wodurch die unabhängige Detektion des Moleküls ermöglicht wird.

Folgende Transfektanten wurden in der murinen Myelomzelllinie P3x63Ag8.653 sowie in einer L-Zelllinie generiert:

hATACR in P3x, 3'c-myc (intrazelluläres c-myc-Epitop)

hATACR in P3x, 5'c-myc (extrazelluläres c-myc-Epitop)

hATACR in L-Zellen, 3'c-myc (intrazelluläres c-myc-Epitop)

Vom Theodor Kocher-Institut, Bern (B. Moser), wurde mir freundlicherweise die hATACR-Transfektante „GPR5/300-19“ mit den dazugehörigen 300-19 Wildtypzellen (murine pre-B-Zell-Linie) überlassen. Diese Transfektante war funktionell auf ihre ATAC-Rezeptor-Expression getestet worden (Kalzium-Einstrom-Messungen).

Weitere Transfektanten, die im Labor bereits vorhanden waren und die in den Experimenten als Kontrollen dienten, waren die murine ATAC-Transfektante B11 (muATAC/P3x-Zellen) und die Transfektante TRAP/P3x.

Die Sequenz des humanen ATAC-Rezeptors wurde mit Hilfe der PCR mit geeigneten Restriktionsschnittstellen versehen und in den eukaryontischen Expressionsvektor BCMGS_{neo} (Karasuyama et al. 1989) einkloniert. Der Vektor kodiert für eine Aminoglykosidphosphotransferase, das Neomycin-Gen (neo^R), welches eukaryontischen Zellen eine Resistenz gegen das die Translation inhibierende Aminoglykosidantibiotikum G418 (Geneticin) verleiht (Colbere-Garapin et al. 1981). Der Vektor wurde unter folgenden Bedingungen durch Elektroporation in die Myelomzelllinie P3x63Ag8.653 (ATCC) transfiziert: 1×10^7 Zellen in 1 ml RPMI 1640 Medium, 30 µg DNA, 1700 V, 25 µF (GenePulser, BioRad). Die Klonierung des Konstruktes und die Transfektion wurde von Dr. H.W. Mages aus unserem Labor durchgeführt.

Die Zellen wurden nach der Transfektion in 7 ml R10F⁺ aufgenommen und 24 h ohne Selektionsmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 18 ml R10F⁺ mit 1 mg/ml G418 aufgenommen (bzw. 0,5 mg/ml für die L-Zellen) und auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten ausplattiert (200 µl/Kavität). Alle 4-7 d wurden 50% des Selektionsmediums gewechselt. Antibiotikaresistente Zellen wurden durchflusszytometrisch und

histologisch mit Hilfe eines gegen das c-myc-Epitop gerichteten mAk (in einer Konzentration von 10 µg/ml) auf ihre ATAC-Rezeptor-Expression analysiert. Positive Klone wurden im nächsten Schritt subkloniert.

2.2.7.1. Subklonierung von Transfektanten

Für die Subklonierung der Transfektanten-Zellen wurden die Zellen zunächst auf bestimmte Zelldichten (verdünnt in R10F⁺) eingestellt, um gemäß der Poisson-Verteilung nach der Aussaat Kavitäten zu erhalten, in denen sich statistisch nur höchstens eine einzelne Zelle befindet (Coller & Coller 1983). Dazu wurden folgende Zellverdünnungen hergestellt, die auf Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (Flachboden, Nunc) ausplattiert wurden: 12,8 Zellen/Kavität (1 Reihe der Mikrotiterplatte), 6,4 Zellen/Kavität (2 Reihen), 3,2 Zellen/Kavität (4 Reihen), 1,6 Zellen/Kavität (6 Reihen), 0,8 Zellen/Kavität (6 Reihen). Das Volumen pro Kavität betrug 200 µl und setzte sich aus 100 µl der jeweiligen Zellverdünnung in R10F⁺ und 100 µl des 2fachen Selektionsmediums zusammen (2x Selektionsmedium, für 100 µl: 30.000 P3x Wildtyp-Zellen, 2 mg/ml G418, 40% konditioniertes Medium von P3x-Zellen in R10F⁺).

2.2.7.2. Kultur von humanen ATAC-Rezeptor Transfektanten

Alle Transfektanten wurden mit einer Dichte von $2-5 \times 10^5$ Zellen/ml unter ständigem Selektionsdruck kultiviert (Selektionsmedium: R10F⁺ mit 1 mg/ml G418 für die P3x Transfektanten bzw. 0,5 mg/ml G418 für die L-Zell-Transfektanten). Die Transfektanten wurden während der Dauer der Kultivierung regelmäßig mit dem c-myc-spezifischen mAk angefärbt, um durchflusszytometrisch die Oberflächen-ATAC-Rezeptor-Expression zu bestätigen.

2.2.8. Herstellung eines ATAC-Rezeptor-spezifischen polyklonalen Antiserums

Zur Generierung eines ATAC-Rezeptor-spezifischen Antiserums (nach Harlow et al. 1988) wurden Kaninchen mit 250 µg des hATACR-Peptids (MESSGNPEST TFFYYDLQSQ PCENQAWVFA T) in kompletten Freundschens Adjuvans immunisiert. Die Immunisierung

wurde 3 mal im Abstand von 3 Wochen jeweils in inkompletten Freundschens Adjuvans wiederholt. 10-12 Tage nach der letzten Immunisierung wurde jeweils ca. 50 ml Blut aus der Halsvene entnommen und zur Gerinnung 30 min. bei 37°C, anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Abtrennung des geronnenen Blutkuchens durch Zentrifugation (10.000 g, 15 min., 4°C) wurde das Serum bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Überprüfung der Sensitivität und Spezifität des Antiserums diente der Western Blot, in dem als Antigen das chemisch synthetisierte ATAC-Rezeptor-Peptid verwendet wurde. Das Kaninchen-Antiserum wurde ebenso wie das Maus-Antiserum für durchflusszytometrische Untersuchungen in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt.

2.2.9. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen ATAC-Rezeptor

2.2.9.1. Immunisierung

Als Antigen für die Immunisierung wurde ein N-terminales hATACR-Peptid (31mer, entsprechend den ersten 31 N-terminalen Aminosäuren der Rezeptor-Molekül-Sequenz, das über KLH gekoppelt war), verwendet. Es wurden insgesamt 6 Mäuse (BALB/c, weiblich, 8 Wochen alt), die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden, nach folgendem Immunisierungsschema immunisiert:

Bei der *ersten Immunisierung* wurden pro Maus 60 µg an **KLH** gekoppeltes hATACR-Peptid in 400 µl PBS mit **komplettem** Freundschens Adjuvans injiziert, und zwar jeweils 30 µg intraperitoneal und 2x15 µg subkutan (an zwei unterschiedlichen Regionen). Beim *ersten und zweiten Boost* wurden jeweils ca. 50 µg hATACR-Peptid-KLH in 400 µl PBS mit **inkompletten** Freundschens Adjuvans intraperitoneal injiziert.

Für den *letzten Boost* vor der Fusion (3 Tage vor der Fusion, 6 Wochen nach dem zweiten Boost) wurde das an BSA gekoppelte hATACR-Peptid verwendet, das intravenös injiziert wurde (50 µg in 100 µl PBS ohne Freundsches Adjuvans). Vor der Fusion wurden die fünf Antiseren der immunisierten Mäuse auf ihre Reaktivität im ELISA getestet. Für den ELISA zum Test der Immunseren wurden die ELISA-Platten sowohl mit 2 µg/ml ungekoppeltem hATACR-Peptid als auch mit dem BSA-gekoppelten hATACR-Peptid (10 µg/ml) beschichtet. Alle fünf Antiseren zeigten in allen getesteten Verdünnungen (1:500 bis 1:2000) ein deutliches Signal im ELISA. (Das Antiserum der für die Fusion verwendeten Maus zeigte in einem später durchgeführten

ELISA-Experiment ein positives Signal bis zu einer Verdünnung von 1:64.000) Es war kein Unterschied detektierbar in der Signalintensität zwischen dem ungekoppelten hATACR-Peptid und dem an BSA gekoppelten Peptid.

2.2.9.2. Fusion mit Polyethylenglycol (PEG)

Die Milz sowie der Thymus der immunisierten Maus wurden steril entnommen, die Organe durch ein feinporiges Gewebesieb gedrückt und in PBS+Pen/Strep resuspendiert. Die Thymozyten und Splenozyten sowie die Myelomzellen wurden zentrifugiert und die Myelomzellen zweimal mit serumfreien RPMI 1640 gewaschen (200 g, 5 min., RT). Da Protein mit der PEG-Wirkung interferiert, ist es unbedingt erforderlich, das FCS vollständig zu entfernen. Zur Lyse der Erythrozyten in der Milzzell-Suspension wurden die Splenozyten in 4 ml Lysepuffer resuspendiert, unter sorgfältigem Überwachen der Reaktion ca. 6 min. inkubiert und anschließend einmal mit PBS+Pen/Strep gewaschen. Die Splenozyten und Myelomzellen wurden in 20 bzw. 30 ml RPMI1640 ohne Serum, die Thymozyten in 20 ml R10F⁻ resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellausbeute betrug 121×10^6 Splenozyten und $12,5 \times 10^6$ Thymozyten. Die Milzzellen wurden mit den gewaschenen Myelomzellen (P3x63Ag8.653) im Verhältnis 2,4:1 (121×10^6 Splenozyten und 50×10^6 P3x) vorsichtig gemischt und zentrifugiert (200 g, 5 min., RT). Die Fusion mit PEG erfolgte nach dem Protokoll von Boehringer Mannheim mit 1 ml 50% PEG 1500. Anschließend wurden 12,5 ml fusionierte Milzzellen (insg. 25×10^6 Zellen, Zelldichte: 2×10^6 /ml) und die Thymozyten ($12,5 \times 10^6$) vorsichtig in insgesamt 125 ml Selektionsmedium (mit Azaserin-Hypoxanthin) mit muIL-6 (Konzentration: 50 U/ml) resuspendiert und je 200 µl pro Kavität in Mikrotiter-Flachbodenplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Der Rest der fusionierten Zellen wurde kryokonserviert (in R20F⁺ mit 10% DMSO).

5 Tage nach der Fusion waren die ersten Klone mikroskopisch sichtbar. Nach 8 Tagen wurde 80-90% des Medium ausgetauscht. Dieser weitgehend vollständige Mediumwechsel ist nötig, um spezifische Antikörper, die von nicht-fusionierten B-Zellblasten sezerniert werden, zu entfernen. Diese Antikörper würden bei der Untersuchung der hATACR-Spezifität von Hybridomzellüberständen mittels ELISA ein deutliches, falsch positives Signal ergeben. Nach 2 Wochen wurde R20F⁺ anstelle des Selektionsmediums als Kulturmedium verwendet. Ab dem zehnten Tag nach der Fusion waren die Hybridome groß genug, um im ELISA auf ihre ATAC-

Rezeptorspezifität hin untersucht werden zu können. Hybridomzellen, deren Überstände im ELISA mehrfach positiv waren, wurden kryokonserviert und subkloniert.

2.2.9.3. Subklonierung und Kultivierung von Hybridomzellen

Da es nicht auszuschließen ist, dass als einzelne Klone erscheinende Zellkolonien nicht doch aus verschiedenen Klonen bestehen, wird mit Hilfe der Limiting Dilution-Subklonierung versucht, diejenigen Zellen aus einem Zellgemisch zu isolieren, die den gewünschten Antikörper produzieren. Alle Hybridomzellen, deren Überstände im ELISA mehrfach ein positives Signal ergaben *und* die in der Durchflusszytometrie spezifisch die 3'-myc/hATACR/P3x-Transfektante erkannten, wurden subkloniert, um dadurch einzelne Klone mit einer guten Immunglobulinsynthese zu erhalten.

Dazu wurden verschiedene Zellverdünnungen (in R10F⁺ mit 50 U/ml muIL-6) hergestellt, zwischen 10 Zellen/Kavität (hohe Wahrscheinlichkeit für das Anwachsen einzelner Klone) und 1,25 Zellen/Kavität (hohe Wahrscheinlichkeit für Monoklonalität, *wenn* ein Klon heranwächst). Anschließend wurden die verschiedenen Verdünnungen der Zellsuspensionen (10, 5, 2, 5 und 1,25 Zellen/Kavität) auf Zellkulturplatten ausplattiert (200 µl pro Kavität, jeweils eine Platte pro Verdünnung, bzw. 2 Platten für die höchste Verdünnung [1,25 Zellen/Kavität]). Nach 7 Tagen wurden 50% des Medium durch neues ersetzt. Nach ca. 2-3 Wochen konnten die Klone im ELISA oder durchflusszytometrisch auf ihre hATACR-Spezifität analysiert werden. Hybridomzellen, deren Überstände ein positives Signal gaben, wurden mit einer Zelldichte von $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen/ml weiterkultiviert und an R10F⁺ ohne Zusatz von IL-6 adaptiert.

In der gleichen Weise wurde ein Teil der Transfektanten subkloniert.

2.2.9.4. Produktion von Hybridomkulturüberstand in größeren Mengen

Die subklonierten Hybridomzellen wurden zur Herstellung von 1-2 Litern Zellkulturüberstand, der für die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern benötigt wird, in größerem Maßstab kultiviert. Dazu wurden die Hybridomzellen in einer Zellkulturflasche bis zu einem Volumen von 100 ml expandiert und mit einer Dichte von $0,5\text{-}0,75 \times 10^6$ Zellen/ml in eine 2 Liter Rollerflasche überführt (Schott). Danach wurden die Rollerflaschen mit geöffnetem Deckel für eine Stunde in einem Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ begast und anschließend mit

geschlossenem Deckel bei 1-2 Umdrehungen pro Minute (UpM) und 37°C kultiviert (Rollkultur). Sobald die maximale Zelldichte erreicht war und das Medium einen leicht gelblichen Farbton hatte, wurden die Zellen mit neuem Zellkulturmedium 1:3 verdünnt und weiter bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen des benötigten Volumens (ca. 1200 ml pro Rollerflasche) wurden die Zellen solange weiter inkubiert, bis 50-80% der Zellen tot waren. Anschließend wurden die Zellen mit 1000 g, 15 min. bei 4°C abzentrifugiert und zur Entfernung von Zell-Debris ein zweites Mal mit 14.000 g, 15 min., 4°C zentrifugiert. Der Hybridomzellüberstand wurde abgenommen, mit 2 M Tris, pH 8,0 neutralisiert, durch Zugabe von Natriumazid (Endkonzentration 0,02%) konserviert und bis zur Aufreinigung bei 4°C gelagert.

2.2.9.5. Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberständen

Die Aufreinigung der monoklonalen Antikörper aus dem Hybridomzellüberstand, der ca. 20-50 µg/ml mAk enthält (Harlow & Lane 1988), erfolgte über eine Protein G Säule (Pharmacia XK16) mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (BioRad EP-1 Econo Pump). Als Säulenmatrix wurde Pharmacia GammaBind Plus Sepharose (5 ml) verwendet. Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt und erfolgten nach Anweisung des Herstellers (Pharmacia). Die Säule wurde zunächst mit mindestens 25 ml PBS äquilibriert bevor sie mit dem Zellkulturüberstand beschickt wurde. Die Fließgeschwindigkeit des Kulturüberstandes über die Säulenmatrix betrug 2-3 ml/min. Anschließend wurde die Matrix mit PBS gewaschen bis zur vollständigen Entfernung kontaminierender Proteine. Zur Elution wurde 100 mM Glycin pH 2,7 verwendet. Der eluierte Antikörper wurde mit 1 M Tris pH 9,0 neutralisiert (zur Vermeidung eines Aktivitätsverlustes der mAk). Die Antikörper-Lösung wurde danach in Dialyse-Schläuche (32 mm, Sigma) transferiert und gegen 1500 ml PBS dialysiert (4°C, Magnetrührer), wobei PBS 2x in 48h gewechselt wurde. Nachdem die Antikörper-Lösung zentrifugiert worden war (zur Entfernung jeglichen übriggebliebenen Debris), konnte die Proteinkonzentration durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm bestimmt werden (1 OD₂₈₀ entsprechen ca. 0,8 mg/ml).

2.2.9.6. Bestimmung des Isotyps und Subtyps der monoklonalen Mausantikörper

Die Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Maus-Antikörper gegen das hATACR/XCR1/GPR5-Protein erfolgte mit Hilfe des Maus-Isotyp-Kits von GibcoBRL. Der Kulturüberstand der Hybridomzellen wurde auf ein Indikatorstäbchen gegeben, das mit Subtyp (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, IgE)- und kappa/lambda Ketten-spezifischen Ratte anti-Maus monoklonalen Antikörpern beschichtet war. Die Detektion von Isotyp, Subtyp sowie Art der leichten Kette des mAk erfolgte durch Zugabe eines markierten Ratte anti-Maus kappa oder lambda mAks.

2.2.10. Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis monoklonaler Antikörper gegen das humane ATAC-Rezeptor-Protein

Für die Detektion monoklonaler Antikörper gegen das hATAC-Rezeptor/XCR1/GPR5-Peptid mit Hilfe des ELISA wurden die ELISA-Platten (MaxiSorp Immuno-Platten, Nunc, Wiesbaden) mit 50 µl/Kavität ungekoppeltem synthetischen hATACR-Peptid (Konzentration 2 µg/ml) in 0,1 M NaHCO₃, pH 8,2 beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 300 µl PBS, wurden die Platten zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen 2 Stunden bei 37°C mit 200 µl Blockadepuffer (PBS/3% (w/v) BSA) (BSA: Sigma, St. Louis, MS; USA) inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit 300 µl PBS+0,05% TWEEN 20 (TWEEN 20: Sigma, St. Louis, MS, USA) gewaschen und dann mit jeweils 50 µl der Hybridomüberstände, einer Positivkontrolle (Mausantiserum, 1:3000 in kompletten Medium verdünnt) und einer Negativkontrolle (Überstand einer Kavität ohne Hybridom) inkubiert. Nach 2 Stunden bei 37°C wurde erneut gewaschen (9x mit 300 µl PBS/0,05% Tween) und dann die gebundenen Antikörper 1 Stunde bei 37°C mit 100 µl anti-Maus-Ig-POD (1:5000 in PBS/5% FCS) markiert. Nach siebenmaligem Waschen mit 300 µl PBS/0,05% Tween wurde für die Entwicklung des ELISA in jede Kavität 100 µl TMB-Substratlösung, zu der 2 µl 30% H₂O₂ gegeben wurden (TMB-Lösung: 1 Tablette TMB (Sigma, St. Louis, MS, USA) in 10 ml Substratpuffer (80,05 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0) gelöst, pipettiert und nach ca. 5-10 minütiger Inkubation bei RT die Enzymaktivität durch Zugabe von 100 µl/Kavität 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion im ELISA-Messgerät (Dynatech Laboratories, Denkendorf) bei 450

nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 630 nm) bestimmt. Die Auswertung des ELISA erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Revelation 2.0 (Dynatech).

2.2.11. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, die die Messung physikalischer, biologischer und biochemischer Eigenschaften von Zellen erlaubt, wurde die Expression von intrazellulären und Oberflächen-Antigenen untersucht. Dabei werden die Zellen, nachdem sie mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden sind, im Durchflusszytometriegerät durch eine Kapillare gedrückt, so dass eine Einzelzellsuspension erzeugt wird, die dann von einem Laserstrahl erfasst wird. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch den Laserstrahl angeregt und die Emission mit einem wellenlängenspezifischen Photodetektor (Photomultiplier) gemessen. Durch die von den Fluoreszenzfarbstoffen ausgesendeten Strahlen unterschiedlicher Wellenlänge können anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) Aussagen über die Expressionsdichte des angefärbten Antigens und die prozentuale Verteilung innerhalb der untersuchten Population gemacht werden. Außerdem wird die Lichtstreuung, die ein Maß für die Zellgröße und -granularität ist, von den Photodetektoren erfasst. Alle Messungen werden gleichzeitig durchgeführt, so dass jede Fluoreszenz einer bestimmten Zelle zugeordnet werden kann.

Die Markierung der Zellen kann entweder direkt erfolgen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist oder indirekt durch einen Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper (anti-Immunglobulin-Reagenz), der den Primär-Antikörper, der das untersuchte Antigen bindet, detektiert. Eine dritte Möglichkeit stellt die Markierung des Antigens durch einen biotinylierten spezifischen Antikörper dar, der in einem zweiten Schritt von fluoreszenzmarkierten Streptavidin gebunden wird.

Ein Vorzug der Durchflusszytometrie gegenüber der Immunhistologie besteht darin, dass bei der Durchflusszytometrie die Expressionsdichte des angefärbten Antigens anhand der mittleren Fluoreszenzintensität quantifiziert werden kann und dass zudem große Populationen lebender Zellen innerhalb kurzer Zeit analysiert werden können, wodurch statistisch relevante Aussagen ermöglicht werden.

2.2.11.1. Nachweis von Zelloberflächenproteinen mittels Durchflusszytometrie

Die Markierung der Zelloberflächen- und intrazellulären Antigene erfolgte sowohl direkt als auch indirekt. Für eine Mehrfachfärbung mit mehreren direkt konjugierten Antikörpern erfolgte die Inkubation mit allen Antikörpern gleichzeitig. Bei einer Doppelfärbung mit einem direkt markierten und einem indirekten Antikörper wurde zunächst die indirekte Färbung und nach Inkubation mit 10%igem Maus-Serum bei 4°C (um unspezifische Bindungen zu blockieren) sowie nach einem Waschschrift dann die Färbung mit dem direkten Antikörper durchgeführt. Die optimalen Konzentrationen der Erst- und Zweitantikörper bzw. fluoreszenzmarkierten Streptavidin sind in Vorexperimenten durch Titrationsreihen bestimmt worden.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Waschpuffer wurde FACS-PBS (PBS/FCS/NaN₃) verwendet, in dem auch die Antikörper verdünnt wurden, die in einem Volumen von 50 µl zu den Zellen hinzugegeben wurden. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 550 g, 5 min., 4°C. Pro Messung wurden 200.000 Zellen eingesetzt, die in die Kavitäten einer Rundboden-Mikrotiterplatte (Nunc) pipettiert wurden. Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert, einmal gewaschen und anschließend für eine indirekte Färbung mit 50 µl/Kavität des spezifischen Erstantikörpers in FACS-PBS (PBS mit 2,5% FCS+0,1% NaN₃) bzw. des Fluoreszenz-markierten (für eine direkte Färbung) oder biotinylierten Antikörpers resuspendiert und für 20-30 min. im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen entfernt.

Bei der Analyse von humanen Monozyten wurden die Zellen vor der Inkubation mit dem Erstantikörper mit Endobulin (humanes Immunglobulin, Immuno, Heidelberg) versetzt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern über F_c Rezeptoren zu vermindern. Dazu wurden die Zellen pelletiert und in 50 µl Endobulin-Lösung (2 mg/ml) in FACS-PBS aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-PBS wurden die Zellen dann mit dem Erstantikörper inkubiert (s.o.). Im Fall der Verwendung von direkt markierten Antikörpern wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen in 150 µl PBS/FCS/NaN₃ aufgenommen und sofort in einem FACSCalibur (Becton-Dickenson) analysiert. Bei Markierung mit unkonjugierten bzw. biotinylierten Antikörpern wurde zweimal gewaschen und dann der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper bzw. das Streptavidin-Konjugat zugegeben und die Proben wiederum 20-30 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Zellen wiederum in 150 µl FACS-PBS aufgenommen und gemessen. Kontrollmarkierungen wurden stets parallel mit Isotypantikörpern wie MOPC 21, 2A11 oder

3G11 durchgeführt, deren Spezifität keine Reaktion mit der zu analysierenden Zellpopulation erwarten ließ und somit als Maß für die unspezifische Bindung und Eigenfluoreszenz der Zellen dienen kann. Die Isotypkontrollantikörper wurden jeweils in der gleichen Konzentration wie die spezifischen Antikörper eingesetzt. Die erforderlichen Konzentrationen lagen bei den hATACR-spezifischen mAbs zwischen 20 und 40 µg/ml (außer 7G11, der in einer Konzentration von 2,5 µg/ml eingesetzt wurde). Der nicht aufgereinigte 6F8 Überstand wurde jeweils unverdünnt eingesetzt. Die Isotyp-Antikörper wurden jeweils in einer Konzentration von 40 µg/ml verwendet. Immunsereen aus Maus und Kaninchen wurden immunfluoreszenzmarkiert (jeweils 1:100 verdünnt).

2.2.11.2. Nachweis von intrazellulären Antigenen mittels Durchflusszytometrie

Zum durchflusszytometrischen Nachweis intrazellulärer Antigene ist die Behandlung der Zellen mit Saponin erforderlich. Saponine sind Glycoproteine, die aufgrund ihrer hohen Affinität zu Cholesterol in cholesterolreichen Zellmembranen ringförmige Komplexe mit einer zentralen Pore (Durchmesser 8-10 nm) bilden. Die intrazelluläre Färbung wurde mit einer Zellzahl von 500.000 Zellen pro Färbung in Eppendorf-Röhrchen durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit FACS-PBS gewaschen und dann mit jeweils 200 µl einer 2%igen Formaldehydlösung (in FACS-PBS verdünnt) für 20 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und dann mit dem monoklonalen Primärantikörper (125 µl pro Färbung), der in Saponinpuffer (0,5% BSA, 0,02% NaN₃, 0,5% Saponin in PBS) verdünnt war, für 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit je 1 ml Saponinpuffer gewaschen und abzentrifugiert (350 g, 5 min., RT). Falls ein direkt konjugierter Primärantikörper verwendet wurde, war die Färbung beendet und die Zellen konnten in 300 µl FACS-PBS aufgenommen und gemessen werden. Bei ungekoppelten oder biotin-markierten Primär-Antikörpern erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper bzw. dem Streptavidin-Konjugat (125 µl in Saponinpuffer verdünnt, 20 min., RT). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in FACS-PBS aufgenommen und gemessen. Falls gleichzeitig Oberflächen- und intrazelluläre Antigene gefärbt werden sollten, wurde die Oberflächenfärbung vor der Formaldehyd-Fixierung der Zellen durchgeführt.

2.2.11.3. Durchflusszytometrische Analyse fluoreszenzmarkierter Zellen (Auswertung der Messdaten)

Die Analyse der immunfluoreszenzgefärbten Zellen erfolgte mit einem FACSCalibur-Gerät (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) unter Verwendung der Software Cell Quest von Becton Dickinson. Es wurden jeweils mindestens 10.000 Zellen pro Probe aufgezeichnet. Vor der eigentlichen Messung erfolgte die Einstellung des Gerätes. Dazu wurde zunächst die zu analysierende Zellpopulation (Lymphozyten und/oder Monozyten) anhand ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) im Scattergramm (korrelierte Darstellung Seitwärts/Vorwärtsstreulicht) elektronisch eingegrenzt („gating“). Mit Hilfe der Färbung mit dem irrelevanten Kontrollantikörper (Antikörper gleichen Isotyps, der gegen ein Antigen gerichtet ist, das von der untersuchten Zellpopulation nicht exprimiert wird; ein Maß für unspezifische Bindung und Eigenfluoreszenz der Zellen) wurden die Statistikmarker gesetzt, die die antigenegative von der antigenpositiven trennen sowie ein Abgleich der Laserspannung der verwendeten Kanäle durchgeführt. In der *Histogramm*-Darstellung wird die Fluoreszenzintensität des gemessenen Antigens logarithmisch gegen die Zahl der gemessenen Ereignisse aufgetragen, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität ein semiquantitatives Maß für die Expressionsdichte des untersuchten Antigens darstellt. In der *Dot Plot*-Darstellung sind die Fluoreszenzintensitäten zweier parallel gemessener Antigene logarithmisch gegeneinander aufgetragen und in Form von Punktwolken dargestellt.

2.2.11.4. Diskriminierung toter Zellen mit Propidiumiodid (PI)

Da tote Zellen unspezifisch Antikörper binden, führen sie zu einer starken Hintergrundfluoreszenz. Propidiumiodid wird nur von toten oder stark beschädigten Zellen aufgenommen, und es ist daher möglich, die Vitalität der Zellen zu beurteilen und nur vitale Zellen zu analysieren. Die Emissionswellenlänge von PI liegt bei etwa 620 nm (gemessen auf FL2 und FL3). Bei gleichzeitiger FITC-Färbung (510 nm, FL1) können daher die PI-gefärbten, toten Zellen elektronisch aus der Darstellung herausgenommen werden, indem während der FACS-Analyse die PI negative Population im „FL2 gegen FL3 Fenster“ elektronisch eingegrenzt („gegated“) wird (Otten, G. et al. 1992). Die Zugabe des Propidiumiodid erfolgte direkt vor der Messung (Endkonzentration: 0,5 µg/ml)

2.2.12. Immunzytochemie

Mit der Immunzytochemie können Antigene fixierter Zellen nachgewiesen werden, vorausgesetzt, dass durch die jeweilige Fixierungsmethode das Antigen nicht soweit denaturiert wurde, dass der Antikörper nicht mehr oder nur noch mit geringer Affinität binden kann. Mit Hilfe der APAAP-Technik wurden entweder Zellen (primäre Zellen oder transfizierte Zellen), die mit der Zytozentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert waren oder Gefrierschnitte aus unterschiedlichen Geweben (Plazenta, Milz, Tonsille) angefärbt. Die APAAP (alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase)-Technik stellt ein sehr sensitives Verfahren dar, mit der auch eine nur geringe Zahl an Antigenkopien pro Zelle nachgewiesen werden kann.

2.2.12.1. Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Mit einer Zytozentrifuge (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) wurden verschiedene Zellen (Transfektanten oder primäre Zellen) auf einen Objektträger aufzentrifugiert und nach der Fixierung mit Hilfe der APAAP-Methode angefärbt. Hierzu wurden jeweils ca. 125-200 µl der Zellsuspension (Zelldichte: $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml) mit einer Zytozentrifuge auf Objektträger zentrifugiert (25 g, 5 min., RT). Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten (bzw. über Nacht bei Acetonfixierung) getrocknet und dann entweder mit einer 4%igen Formaldehydlösung in PBS (20 min., RT) oder mit Aceton (10 min., RT) fixiert. Im Falle einer Fixierung mit Formaldehyd wurden die Proben noch 4x mit PBS gewaschen (je 5 min., RT) und entweder sofort verwendet oder in PBS bei 4°C aufbewahrt. Die mit Aceton fixierten Präparate wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.12.2. Herstellung von Gefrierschnitten

Die Gewebe (Plazenta, Tonsille, Milz) wurden direkt nach ihrer Entnahme präpariert. Kleinere Stücke der Gewebe (5x5x5mm) wurden in Flachboden Polyethylen-Gefäße (Roth) gegeben, mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 (w/v) NaCl) bedeckt und in aufrechter Position in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde das Cryostat-Gerät (Reichert-Jung, 2800 Frigocut E) zunächst auf eine Temperatur von -20°C eingestellt und die Gewebe vor Beginn des Schneidens für mindestens 30

Minuten in dieser Temperatur belassen. Zum Schneiden wurden je nach Gewebe Temperaturen zwischen -10 und -20°C gewählt. Die typische Schnittdicke betrug 5-8 µm. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht, die vorher mit 2%iger APES-Lösung in EtOH_{abs} (2% 3-Aminopropyltriethoxysilane, Sigma, Heidelberg) beschichtet worden waren (30 sec. Aceton, 10 sec 2% APES, 2x10 sec EtOH_{abs}, 2x10 sec. H₂O_{bidest}, über Nacht bei 50°C getrocknet) und nachdem die Präparate für 12-24 h luftgetrocknet worden waren, für 10 min. in Aceton fixiert. Falls sich nicht unmittelbar darauf die Färbung anschloss, wurden die Objektträger bei -80°C gelagert.

2.2.12.3. Nachweis von Antigenen mittels APAAP-Technik

Bei der APAAP-Technik (Cordell et al. 1984; Mason 1985) handelt es sich um eine Enzym-anti-Enzymkomplex-Technik, mit der eine Verstärkung des Signals erreicht werden kann. Das Antigen wird nacheinander mit unkonjugiertem Primärantikörper, unkonjugiertem Sekundärantikörper (Brückenantikörper), löslichen Enzym-anti-Enzymkomplexen und Substratlösung inkubiert, wobei der Primärantikörper und der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes aus derselben Spezies stammen, so dass der Sekundärantikörper in der Lage ist, diese beiden zu verbinden. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT in einer feuchten Kammer. Bei -80°C gelagerte Präparate wurden vor Beginn der Färbeprozedur für 20 min. bei RT gelagert. Im Falle einer Anfärbung von intrazellulären Antigenen wurde zunächst die Zellwand für die Antikörper permeabel gemacht, indem die Präparate 90 sec. mit PBS/1% Triton inkubiert und anschließend 3x mit PBS (je 5 min.) gewaschen wurden, bevor sie in APAAP-Waschpuffer gegeben und mit der Färbeprozedur begonnen wurde.

Für die eigentliche Färbung wurden die Proben zunächst mit einem Wachs-Stift (Dako) markiert und mit 100 µl des optimal verdünnten monoklonalen Primärantikörpers (in APAAP-Medium: RPMI 1640, 10% FCS, 0,1% NaN₃) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (1-2 min.) erfolgte eine dreißigminütige Inkubation mit dem Sekundär- bzw. Brückenantikörper (100 µl pro Schnitt), der in Blockierungsmedium (APAAP-Medium mit 10% Normal-Serum, das aus derselben Spezies wie das Gewebe stammte) verdünnt wurde. Als Sekundärantikörper wurde entweder Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (1:20 verdünnt, DAKO) oder Kaninchen-anti-Ratte-Immunglobulin (1:50 in APAAP-Medium verdünnt, DAKO) verwendet. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Schnitte für 30

min. mit dem APAAP-Komplex inkubiert, wobei der Maus-APAAP-Komplex 1:20 und der Ratten-APAAP-Komplex 1:50 (beide DAKO) in APAAP-Medium verdünnt wurden. Danach wurde wiederum zweimal gewaschen und die letzten beiden Inkubationsschritte noch einmal wiederholt, wobei die Inkubationszeit jedoch auf 10 min. reduziert war. Dadurch kann die Intensität der Immunfärbung gesteigert werden. Vor Beginn der Färbereaktion wurden die Präparate wiederum gewaschen (3-4 x 1 min.). Die Färbelösung wurde direkt vor Gebrauch frisch hergestellt. Durch Zugabe des Neufuchsin-Substrates (Inkubation 10-20 min. auf einem Schüttler) konnte die Bindung des Primärantikörpers durch einen roten Farbniederschlag sichtbar gemacht werden. Nach einem Waschschrift erfolgte die Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun (5 min.). Die Reaktion wurde durch Waschen gestoppt und die Präparate mit Kaisers Glyceringelatine und Deckgläschen konserviert.

Die Konzentration der verwendeten Primärantikörper betrug 10 µg/ml; die Hybridomüberstände wurden jeweils unverdünnt eingesetzt.

Puffer und Medien zu 2.2.12.

APAAP-Medium	RPMI 1640, 10% FCS, 0,1% NaN ₃ , pH 7,4-7,6
Blockierungs-Medium	APAAP-Medium, 10% Normal-Serum
Waschpuffer	1,8 g Tris Base, 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, ad 2 l H ₂ O, pH 7,4-7,6
Entwicklungspuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 4,9 g Tris Base, ad 1 l H ₂ O pH 8,9
Propandiol-Lösung	200 mM 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol, ad 1 l H ₂ O
Neufuchsin-Stock	136,6 mM in 100 ml 2 M HCl
Mayers Hämalaun	3,1 mM Hämatoxilin x H ₂ O, 1 mM 0,2 g NaIO ₃ , 105 mM Kalialaun, ad 1 l H ₂ O, über Nacht gerührt
	302 mM Chloralhydrat, 4,7 mM Citric Acid x H ₂ O, über Nacht gerührt

Chemikalien zu 2.2.12.

Aceton	Merck
APES (3-Aminopropyltriethoxysilan)	Sigma (Deisenhofen)
Tris-Base („Trizima“)	Sigma (Deisenhofen)

Tris/HCl	Sigma (Deisenhofen)
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol	Merck
Levamisole	Sigma (Deisenhofen)
(L-)-2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazol [2,1-b] thiazol)	
Naphtol-As-Bi-Phosphat	Sigma (Deisenhofen)
DMF	Merck
Sodiumnitrite (NaNO ₂)	Sigma
Neufuchsin	Merck
Hämatoxilin Monohydrat	Merck
Natriumiodat	Merck
Kalialaun	Merck
Chloralhydrat	Merck
Citronensäuremonohydrat	Merck
Eosin	Dako

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Immunpräzipitation

Als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation des nativen ATAC-Rezeptor/XCR1/GPR5-Proteins dienten sowohl Zell-Lysate von hATACR-Transfektanten als auch Lysate von primären Zellen (mit Ionomycin und PMA aktivierte und ruhende NTCs + PBMCs sowie 24 h LPS-stimulierte und ruhende Monozyten). Die Zellen wurden zunächst in kalter PBS gewaschen (350 g, 6 min., 4°C) und das Zellsediment, falls es nicht sofort verwendet wurde, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung der Lysate wurden für ein kleines Gel jeweils 15x10⁶ NTCs und PBMCs bzw. 5x10⁶ transfizierte Zelllinien in Lysepuffer (1 ml Lysepuffer für 10x10⁶ Zellen) mit verschiedenen Proteasehemmern (PMSF 1 mM, Aprotinin 10 µg/ml, Leupeptin 10 µM, Pepstatin A 1 µM) 60 Minuten auf Eis inkubiert. Für ein großes Gel wurden Lysate aus 50x10⁶ NTCs/PBMCs bzw 20x10⁶ Monozyten und 10x10⁶ Transfektantenzellen verwendet. Nach Inkubation mit dem Lysepuffer und den Proteasehemmern wurden die Lysate zentrifugiert (12.000 g, 15 min., 4°C, Sorvall Zentrifuge) und der Überstand entweder sofort für die Immunpräzipitation verwendet oder bei -20°C gelagert.

Die Immunpräzipitation wurde entweder mit den neu generierten hATACR-spezifischen/XCR1 mAKs oder dem c-myc-spezifischen Antikörper (Im Falle der Transfektanten) in Kombination mit Protein G, welches an Sepharose immobilisiert war (Pharmacia) durchgeführt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Es wurden zunächst mit Hilfe einer Voradsorption („Preclearings“) die Proteine entfernt, die unspezifisch an die für die Präzipitation verwendeten Antikörper binden würden. Hierzu wurden die verschiedenen Lysate mit dem nicht-spezifischen mAk 2A11 (10 µg für 5×10^6 Transfektanzellen bzw. 10 µg für 10×10^6 primäre Zellen) sowie Protein G Sepharose (20%ige (w/v) Suspension mit Protein G-Sepharose und Sephadex G50 im Volumenverhältnis 1:2 in PBS) für 2x2h in einem Über-Kopf-Schüttler bei 4°C inkubiert. Es wurden jeweils 50 µl Protein G Sepharose für 5×10^6 Transfektanzellen bzw. 50 µl für 10×10^6 primäre Zellen verwendet. Anschließend wurde die Matrix mit den unspezifischen Immunkomplexen sedimentiert (350 g, 5 min., 4°C), der Überstand abgenommen und das hATACR/XCR1-Protein aus dem Überstand über Nacht unter Verwendung verschiedener Antikörper (Hybridom-Überstände: jeweils 5 ml Überstand für ein kleines bzw. 10 ml für ein großes Gel, aufgereinigte mAKs (5C5+6D2+1F1) jeweils 10 µg bzw. 20 µg für ein großes Gel, 7G11: 2,5 µg) sowie Protein G Sepharose in einem Über-Kopf-Schüttler bei 4°C immunpräzipitiert. Als Positivkontrolle wurde ein Antikörper, der das c-myc Epitop der Transfektanten spezifisch erkannte, verwendet. Als Negativkontrolle wurden die Protein G-beads aus der Voradsorption verwendet. Nach ca. 12 h bei 4°C und kontinuierlicher Rotation wurden die Immunkomplexe abzentrifugiert (1000 g, 1 min., 4°C), der Überstand verworfen und die Protein G-Antigen-Antikörper-Konjugate (Präzipitat) mit 1 ml 4°C kalten Waschpuffer in Eppendorfgefäße (1,5 ml) überführt und insgesamt viermal gewaschen (1000 g, 1 min., 4°C), um nicht-spezifisch gebundene Proteine möglichst weitgehend zu entfernen. Das Sediment wurde zur Elution der präzipitierten Proteine in 20 µl 3x SDS-Probenpuffer (gemäß Sambrook et al. 1998) resuspendiert und für 4 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proteinproben auf Eis abgekühlt und nach kurzer Zentrifugation entweder sofort auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

Materialien zu 2.3.1.

Lysepuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8) 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, + Proteasehemmer (s.u.) + 1% (v/v) Nonident P-40, Proteasehemmer 1 mM PMSF, 10 µM Leupeptin A, 1 µM Pepstatin, 10 µg/ml Aprotinin
Waschpuffer	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH8

2.3.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden in jeweils 20 µl bzw. 50 µl (großes Gel) reduzierendem 4x-Protein-Probenpuffer resuspendiert, nach Denaturierung (4 min., 95°C) auf Eis abgekühlt, zur Entfernung der Gelpartikel für 1 min. bei 12.000 g zentrifugiert und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen (7 cm x 8 cm x 0,075 cm bzw. großes Gel: 16 cm x 20 cm x 0,1 cm). Die SDS-PAGE erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) und wurde in Gegenwart von SDS (Natriumdodecylsulfat) und DTT (Dithiothreitol) durchgeführt. SDS ist ein starkes anionisches Detergenz, das relativ gleichmäßig an Proteine bindet (ca. 1,4 mg SDS/Polypeptid) und den Protein/Detergenz-Komplexen eine zur Proteingröße proportionale Nettoladung verleiht, die das Molekül im elektrischen Feld durch das Gel wandern lässt, wobei die Geschwindigkeit dabei vor allem von der Molekülgröße bestimmt wird. DTT ist ein Disulfidbrücken-reduzierendes Agens, das zusammen mit SDS eine Denaturierung und Entfaltung von Proteinen bewirkt. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Polypeptid-SDS-Komplexe hängt unter diesen Bedingungen nur noch von dem Molekulargewicht des Proteins und nicht mehr von seiner ursprünglichen Nettoladung oder Form ab. Dabei verhält sich die relative Mobilität der Proteine in der SDS-PAGE umgekehrt proportional zum Logarithmus (\log_{10}) ihres Molekulargewichtes.

Die Polyacrylamidgele bestanden zu zwei Dritteln aus einem Trenngel (12% Polyacrylamid, 2,5 M Tris/HCl pH 8, 20% SDS) und zu einem Drittel aus einem Sammelgel (4% Polyacrylamid, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,1% SDS). Die Elektrophorese wurde in einer Mini Protean II-Kammer bzw. einer Protean II xi-Kammer für ein großes Gel (beide BioRad) im Elektrophoresepuffer 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS bei RT (kleines Gel) oder 4°C (großes Gel) durchgeführt. Die Apparaturen wurden jeweils nach Herstellerangaben zusammengesetzt, unter Verwendung von 0,75 mm bzw. 1,0 mm (großes Gel) Abstandshaltern.

In die Gelkammer wurde eine 12%ige Trenngellösung pipettiert, mit Wasser überschichtet und zur Polymerisation ca. 1 Stunde bei RT inkubiert (großes Gel: 1,5 Stunden). Nach Entfernung des Wassers wurde die Gelkammer mit 4%igem Sammelgel gefüllt und für die Probenaschen ein Kamm eingesetzt (10 Taschen bei einem kleinen bzw. 15 Taschen bei einem großen Gel). Nach der Polymerisation des Sammelgels (ca. 30 min. bzw. 60 min.) wurde das Gelsystem nach Ausspülen der Geltaschen mit H₂O_{bidest}/destilliertem Wasser in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, der Elektrophoresepuffer eingefüllt und je 20 bzw. 50 µl der Proben in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtstandard wurde eine 6-60 kDa Proteinleiter (Gibco) verwendet. Die Laufspannung betrug im Sammelgel 50 V und im Trenngel 100 V. Sobald die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel für den Western Blot verwendet.

Lösungen zu 2.3.2.

Elektrophoresepuffer	25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
Trenngel	12% Polyacrylamid, 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1% SDS
Sammelgel	4% Polyacrylamid, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,1% SDS
SDS-Protein-Probenpuffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% (v/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 0,1 M Dithiothreitol

2.3.3. Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Nachdem die Proteine im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt worden waren, wurden sie unter Einfluss eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes auf eine proteinbindende Polyvinylidendifluorid-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert („Western Blotting“; Burnette 1981) und mittels polyklonalem Antiserum nachgewiesen.

Der Proteintransfer erfolgte unter semi-dry Bedingungen in einer Blotapparatur in Transferpuffer bei 0,9 mA/cm² für 1 h bzw. für 1,5 h bei einem großen Gel (Kyhse-Andersen 1984). Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran zur Visualisierung des Molekulargewichtsmarkers in Poinceau S-Lösung (0,2% (w/v) in 3%iger Essigsäure) gefärbt, die sichtbaren Proteinbanden des Molekulargewichtsmarkers mit einem Bleistift markiert und die

Membran anschließend durch mehrmaliges Waschen in PBS entfärbt. Die Membran wurde zum Nachweis des hATACR-Proteins zunächst über Nacht in Blockierungspuffer (2% (w/v) Milchpulver in PBS-T) bei 4°C unter Schütteln inkubiert und dann für 1 h bei RT mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-hu-ATACR-Antiserum (1:2500 verdünnt in Blockierungspuffer) unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungspuffer (je 10 min.) erfolgte die Nachweisreaktion mit dem Western Light Kit (Tropix) gemäß den Angaben des Herstellers mit einem Biotin gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:5000 verdünnt in Blockierungspuffer) als sekundärem Antikörper, anschließend wurde die Membran nach dreimaligem Waschen (s.o.) mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt an Avidin (Avidx-AP, 1:10.000 in Blockierungspuffer) inkubiert. Als Substrat der enzymatischen Chemiluminiszenzreaktion wurde CDP-Star (Tropix, 1:50 in Assay buffer) verwendet, die Exposition des Blots erfolgte auf einem XOMatAR-Film (Kodak)

Lösungen zu 2.3.3

Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol
PBS-T	PBS + 0,1% (w/v) Tween-20

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des humanen ATAC-Rezeptors [XCR1/GPR5]. Hierzu sollten monoklonale Antikörper hergestellt werden, mit deren Hilfe das Expressionsmuster des Rezeptors aufgeklärt werden sollte.

Als Hilfsmittel für die Etablierung und Charakterisierung der mAks sollten zunächst verschiedene Zelllinien generiert werden, die den ATAC-Rezeptor überexprimieren.

3.1. Etablierung von Transfektanten, die den humanen ATAC-Rezeptor überexprimieren

Es wurden verschiedene Zelllinien generiert, die den humanen ATAC-Rezeptor/XCR1 in hoher Dichte auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Als Zelllinien für die Transfektion dienten sowohl P3x63Ag8.653-Zellen (Myelomzelllinie aus Balb/c-Mäusen) als auch die adhärent wachsenden L-Zellen. In den transfizierten Zelllinien ist das hATACR-Molekül entweder am C-terminalen, intrazellulären 3' Ende (3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante bzw. 3'c-myc/hATACR/L-Zell-Transfektante) oder am N-terminalen, extrazellulären 5' Ende (5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante) mit einem c-myc Epitop fusioniert. Dieses „c-myc-tag“ dient als Marker und ermöglicht die unabhängige Detektion des Moleküls. (Abb. 1)

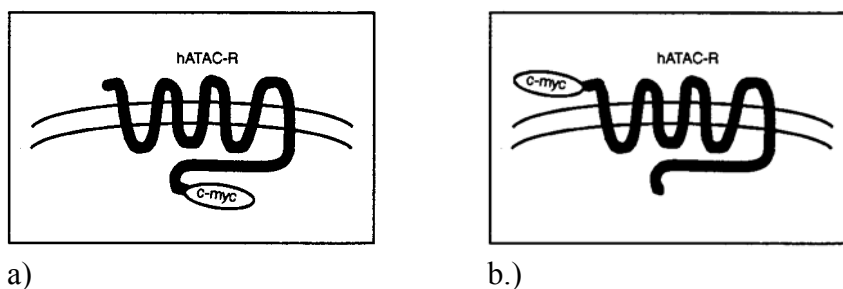


Abb. 1 Der hATAC-Rezeptor mit dem c-myc Epitop am 3' bzw. 5'-Ende
a.) Das hATACR Protein mit c-terminalem intrazellulärem c-myc Epitop (3'c-myc)
b.) Das hATACR Protein mit N-terminalem extrazellulärem c-myc Epitop (5'c-myc)

Nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium (enthält 1 mg/ml G418 bzw. 0,5 mg/ml G418 für die L-Zell-Transfektanten) aufgenommen und auf je einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten ausgesät.

Auf der Platte mit den 5'c-myc-Zellen wurden insgesamt 19 Klone erhalten, auf der 3'c-myc-Platte 25 Klone und auf der Platte mit den L-Zellen 7 Klone. Jeder dieser antibiotikaresistenten Klone wurde in einem ersten Screeningprozess mit einem c-myc-Epitop-spezifischen monoklonalen Antikörper (Konzentration 10 µg/ml) immunfluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch analysiert, wobei die 3'c-myc-Klone mit einer intrazellulären Färbung und die 5'c-myc-Klone mit einer Oberflächen-Immunfluoreszenzfärbung des c-myc-Epitops selektiert wurden. Die Auswahl der positiven Klone erfolgte dabei auf der Grundlage der unterschiedlichen Reaktivität des c-myc-Antikörpers mit den transfizierten Zellen einerseits und den untransfizierten Wildtypzellen andererseits. Auf diese Weise konnten von der transfizierten P3x-Zelllinie mehrere Klone erhalten werden, die den ATAC-Rezeptor in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche exprimieren: Von den insgesamt 19 bzw. 25 G418-resistenten 3' bzw. 5'c-myc-Klonen konnte mit Hilfe des durchflusszytometrischen Screenings bei jeweils 5 bzw. 7 Klonen eine gute hATACR-Expression nachgewiesen werden. Von diesen positiven Klonen wurden Klon 15 (3'c-myc) bzw. Klon 9 (5'c-myc) auf der Grundlage ihrer besonders guten Reaktivität mit dem c-myc-spezifischen Antikörper ausgewählt. Bei den L-Zellen konnte lediglich ein Klon mit einer guten Expression (Klon 5) und drei weitere mit einer nur mäßigen Expression gewonnen werden. Zwei der 5'c-myc/hATACR/P3x-Klone wurden mit Hilfe der Limiting-Dilution-Methode subkloniert.

Abbildung 2 zeigt das mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmte Expressionsniveau der drei generierten hATACR-Transfektanten.

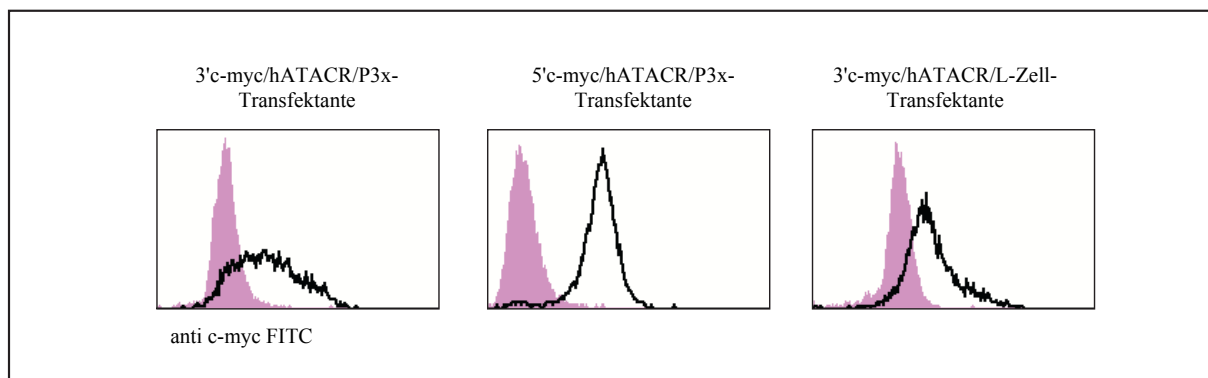


Abb. 2 Durchflusszytometrische Bestimmung des Expressionsniveaus der verschiedenen hATACR-Transfektanten

Durchflusszytometrische Färbung der Transfektanten mit einem c-myc-Epitop-spezifischen Antikörper. Dunkel hinterlegt sind jeweils die nichttransfizierten Wildtypzellen als Kontrolle gezeigt.

(x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Zur Bestätigung der Rezeptorexpression der P3x-hATACR-Transfektanten wurden Zytozentrifugenpräparate der verschiedenen G418-resistenten Klone angefertigt und anschließend mit einem monoklonalen anti-c-myc-Antikörper mit Hilfe der APAAP-Technik angefärbt. Es zeigte sich eine spezifische Anfärbung der positiven Klone, die mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie korrelierte. Die P3x-Wildtypzellen waren nicht angefärbt (Daten nicht gezeigt).

Während der Kultivierung und Expansion der Transfektanten wurde beobachtet, dass erhebliche Schwankungen im Expressionsniveau des hATAC-Rezeptors bestanden (siehe Diskussion). Daher wurden alle Transfektanten unter ständigem Selektionsdruck (Zellkulturmedium mit G418) kultiviert, um einen Expressionsverlust zu verhindern. Im Falle der 3'-c-myc/hATACR/P3x-Transfektante wurden jedoch auch unter diesen Kulturbedingungen weiterhin Schwankungen im Expressionsniveau beobachtet. Daher sollte die Rezeptorexpression der Transfektanten neben der Durchflusszytometrie-Färbung mit dem c-myc-spezifischen Antikörper und der immunhistochemischen Analyse von Zytospins durch eine weitere Untersuchung verifiziert werden.

Als ein gutes Korrelat für die Rezeptor-Expressionsdichte der Transfektanten erwies sich neben der durchflusszytometrischen Untersuchung der c-myc-Expression auch die Anfärbung der transfizierten Zellen mit ATAC-Rezeptor spezifischen Immunsereen (Maus und Kaninchen) mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Die Transfektanten wurden jeweils sowohl mit den Immunsereen als auch mit den Präimmunsereen inkubiert. Die Helligkeit der Färbung mit den Immunsereen korrelierte mit der Rezeptor-Expressionsdichte der Transfektanten, wie sie mit Hilfe des c-myc-spezifischen Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt worden war. Mit den Präimmunsereen zeigte keine der Transfektanten eine Reaktivität.

Aufgrund der oben erwähnten erheblichen Schwankungen im Expressionsniveau (siehe Diskussion) wurde die Rezeptorexpression der Transfektanten im Verlauf der Kultivierung regelmäßig durchflusszytometrisch überprüft.

Die Abbildung 3 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung der 3'-c-myc/hATACR/P3x-Transfektante mit den Immunsereen von Maus bzw. mit dem c-myc-Antikörper an unterschiedlichen Tagen im Verlauf der Kultivierung.

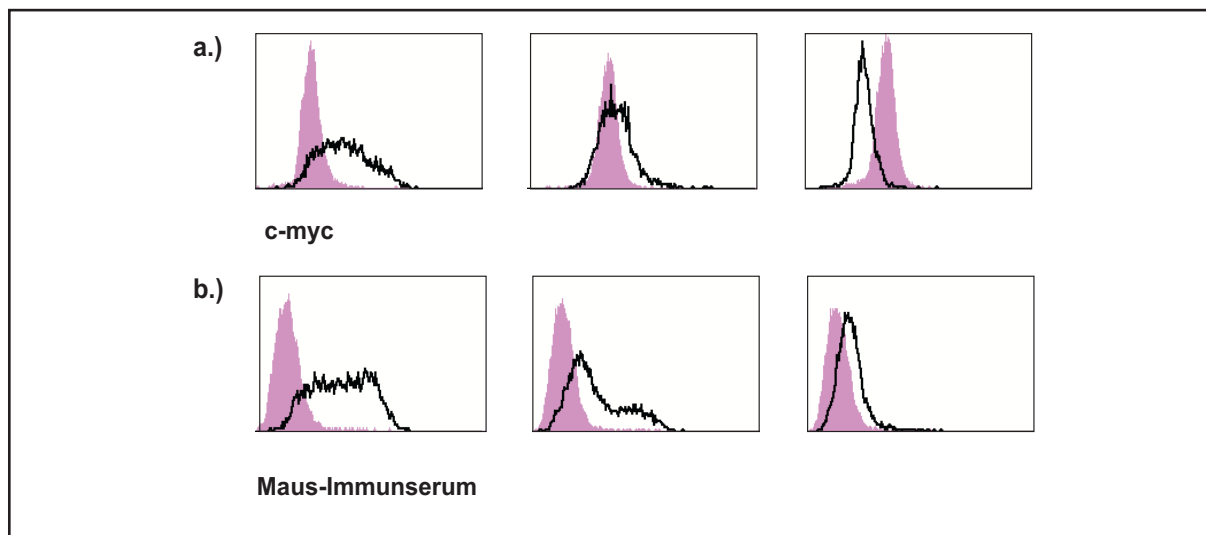


Abb. 3 Schwankungen im Expressionsniveau der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante
a.) FACS-Analyse der c-myc-Expression der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante an drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung im Vergleich zu den Wildtypzellen (dunkel hinterlegt)
b.) FACS-Analyse der Reaktivität des polyklonalen hATACR-spezifischen Maus-Antiserums mit der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante an drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung im Vergleich zu den Wildtypzellen (dunkel hinterlegt)
(x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

3.2. Generierung monoklonaler Antikörper gegen den humanen ATAC-Rezeptor

Zur Charakterisierung des humanen ATAC-Rezeptors (XCR1/GPR5) wurden zunächst ATAC-Rezeptor-spezifische monoklonale Antikörper hergestellt. Als Antigen für die Immunisierung der BALB/c-Mäuse diente ein chemisch synthetisiertes (Merrifield-Festphasensynthese), 31 mer großes, N-terminales hATACR-Peptid, entsprechend den ersten 31 N-terminalen Aminosäuren des ATAC-Rezeptors, das von Dr. Henklein (HU Berlin) synthetisiert worden war.

Nach der Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen einer Maus, die mit dem N-terminalen hATACR-Peptid immunisiert worden war, wurden die Hybridom-Zellen auf 7 Mikrotiterplatten mit je 96 Kavitäten ausgesät und für die ersten zwei Wochen mit Selektionsmedium (enthält Azaserin-Hypoxanthin) kultiviert.

In einer ersten Analyse der Spezifität der Hybridomzellüberstände wurde die Fähigkeit der Hybridome, an das synthetische hATACR-Peptid zu binden in einem ELISA untersucht. Zur Beschichtung der ELISA-Platten diente das ungekoppelte hATACR-Peptid. Dabei konnte bei 47 Hybridomen (von insgesamt 588 untersuchten Hybridomen) ein positives Signal im ELISA erhalten werden. Nach zwei weiteren Screeningrunden wurden insgesamt 54 positive Klone

identifiziert, die das ungekoppelte synthetische ATAC-Rezeptor-Peptid erkannten. Alle Hybridome, die im ELISA mindestens einmal positiv waren, wurden anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf der Grundlage ihrer unterschiedlichen Reaktivität mit den hATACR-transfizierten Zellen weiter analysiert. Als Negativkontrolle diente ein Isotypkontrollantikörper. Für das erste durchflusszytometrische Screening wurde eine P3x-Transfektante mit extrazellulärem c-myc-Epitop („5'c-myc/hATACR/P3x“) verwendet und mit den verschiedenen Hybridomüberständen angefärbt. Dabei erkannte überraschenderweise *keiner* der Überstände, die im ELISA zuvor alle ein positives Signal geliefert hatten, die hATACR-transfizierten Zellen. Es wurde daher eine weitere durchflusszytometrische Analyse der Hybridomzellüberstände durchgeführt, diesmal mit der Transfektante mit dem *intrazellulären* c-myc Epitop („3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante“), mit der dann auch – im Gegensatz zur Transfektante mit dem extrazellulären c-myc Epitop („5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante“) – mehrere Hybridome spezifisch reagierten. Die Hybridomüberstände 5C5, 1F1 und 6D2 erkannten spezifisch nur die Transfektante und nicht die untransfizierten Mutterzellen (P3x). Alle positiven (d.h. sowohl im ELISA als auch im FACS-Screening positiven) Hybridome wurden mit Hilfe der Limiting dilution - Methode subkloniert und die so gewonnenen Subklone dem gleichen, im vorangegangenen beschriebenen, Screeningprozess unterzogen. Dadurch konnten schließlich drei Hybridome etabliert werden, die sowohl mit dem synthetischen Peptid im ELISA reaktiv waren als auch in der Durchflusszytometrie spezifisch die 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante erkannten (Abb. 4). Darüber hinaus wurde mit 6F8 ein weiterer Hybridom-Überstand ausgewählt, der zwar für durchflusszytometrische Messungen nicht geeignet war, aber im ELISA und später in der Immunpräzipitation eine ausgesprochen gute Reaktivität zeigte. Dies bestätigt, dass gegen dasselbe Epitop gerichtete mAbs sich unterschiedlich gut für bestimmte Techniken eignen können (Peters&Baumgarten, 1990)

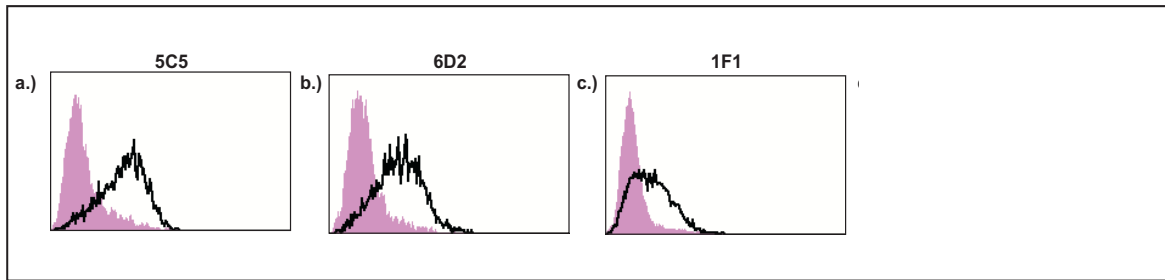


Abb. 4 **Reaktivität der drei hATACR-Hybridom-Überstände mit der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante:**

a.) 5C5

b.) 6D2

c.) 1F1

Dunkel hinterlegt ist jeweils die Reaktivität der Überstände mit den nichttransfizierten Wildtypzellen dargestellt. Alle Überstände sind unverdünnt eingesetzt.

(x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Zur weiteren Charakterisierung wurden zunächst der Isotyp und Subtyp der Antikörper bestimmt und dann die monoklonalen Antikörper 5C5, 6D2 und 1F1 affinitätschromatographisch mit Protein G aufgereinigt. Der 6F8-Überstand wurde nicht aufgereinigt. Die Iso- und Subtypen der mAKs sind in Tabelle 1 dargestellt.

Bei dem mAk „7G11“ handelt es sich um einen hATACR-spezifischen mAk, der mir freundlicherweise von Dr. Quin (Leukosite, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Antikörper war bislang noch nicht näher charakterisiert worden und wurde bei allen meinen Experimenten mitgeführt.

Monoklonaler Antikörper	Isotyp
5C5	IgG ₁ , kappa
6D2	IgG ₁ , kappa
1F1	IgG ₁ , kappa
6F8	IgM
7G11 (USA)	IgG2a

Tab.1 Iso- und Subtypen der hATACR-spezifischen mAKs

Nach der Aufreinigung wurden die mAKs erneut durchflusszytometrisch getestet. Überraschenderweise war jedoch die Reaktivität der *aufgereinigten* Antikörper mit den hATACR-transfizierten Zellen schwächer als bei Verwendung der Hybridom-Überstände. Außerdem fiel auf, dass der mAk 7G11 eine Reaktivität sowohl mit der Transfektante als auch mit den Wildtypzellen zeigte.

Die folgende Abbildung zeigt die Reaktivität der *aufgereinigten* mAKs mit der 3'-myc/hATACR/P3x-Transfektante.

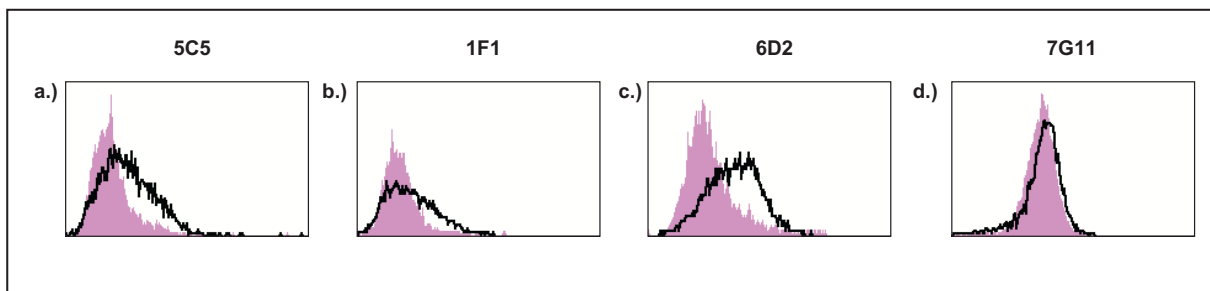


Abb. 5 **Reaktivität der aufgereinigten hATACR-spezifischen mAKs mit der 3'-myc/hATACR/P3x-Transfektante**

- a.) 5C5
- b.) 1F1
- c.) 6D2
- d.) 7G11

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung der hATACR-Transfektante und der nichttransfizierten Wildtypzellen (dunkel hinterlegt) mit den aufgereinigten hATACR-spezifischen mAKs. Die Zellen wurden mit den angegebenen mAKs unter Verwendung eines FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus Sekundärreagenz gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

3.2.1. Charakterisierung der vier mAKs 5C5, 6D2, 1F1, 7G11 sowie des Überstandes 6F8

3.2.1.1. Durchflusszytometrische Analyse von allen vorhandenen hATACR-Transfektanten mit den mAKs

Aufgrund des überraschenden Ergebnisses der schwächeren Reaktivität der aufgereinigten mAKs mit den Transfektanten im Vergleich zur Reaktivität der Hybridomüberstände vor der Aufreinigung sollte zunächst eine genauere durchflusszytometrische Analyse der Spezifität der mAKs durchgeführt werden. Hierzu wurden *alle* vorhandenen hATACR-Transfektanten sowie die nichttransfizierten Mutterzellen mit den verschiedenen mAKs unter Verwendung eines FITC-

konjugierten Sekundärreagenzes immunfluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch analysiert. Folgende Transfektanten standen zur Verfügung:

- 1.) 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante (intrazellulärer c-myc-Marker)
- 2.) 5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante (extrazellulärer c-myc-Marker)
- 3.) 3'c-myc/hATACR/L-Zell-Transfektante (intrazellulärer c-myc-Marker)
- 4.) hATACR/300-19-Transfektante („GPR5/300-19-Transfektante“, kein c-myc-Marker)

Als Positivkontrolle dienten jeweils Färbungen mit den polyklonalen hATAC-Rezeptor-spezifischen Antisera aus Maus und Kaninchen sowie die Färbung mit dem c-myc-spezifischen Antikörper. Als Negativkontrollen wurden neben den Wildtypzellen, der Isotypkontrolle, einer ungefärbten Kontrolle sowie einer Färbung mit den beiden Präimmunseren auch die murine ATAC-Transfektante B11 (ATAC/P3x) und die TRAP-Transfektanten (TRAP/P3x und TRAP/L-Zellen) verwendet.

Die Ergebnisse der Experimente waren insgesamt widersprüchlich: Die drei aufgereinigten monoklonalen Antikörper (5C5, 1F1, 6D2) verhielten sich untereinander insofern ähnlich, als sie alle drei ausschließlich die 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante (mit dem intrazellulären c-myc-Epitop) und nicht die 5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante (mit dem extrazellulären c-myc-Epitop) erkannten. Die als Negativkontrollen verwendeten Transfektanten TRAP/P3x und muATAC/P3x und die Wildtypzellen (P3x, L-Zellen, 300-19) wurden von diesen drei Antikörpern nicht angefärbt. Ebenfalls *keine* Reaktivität zeigten diese mAKs mit der 3'c-myc/hATACR/L-Zell-Transfektante und der hATACR/300-19-Transfektante.

Der mAK 7G11 reagierte mit allen untersuchten P3x-Transfektanten und der hATACR/300-19-Transfektante („GPR5/300-19-Transfektante“) *sowie* mit den untransfizierten Mutterzellen gleichermaßen, während er mit den 3'c-myc/hATACR/L-Zell-Transfektanten und den Wildtyp-L-Zellen keine Reaktivität zeigte. Die hATACR/300-19-Transfektante war somit einzig mit dem mAK 7G11 reaktiv. Die Ergebnisse aller Durchflusszytometrie-Färbungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

Zelllinie	Monoklonaler Antikörper			
	6D2	5C5	1F1	7G11
3'c-myc/hATACR/P3x	++	++	+	++
5'c-myc/hATACR/P3x	-	-	-	++
P3x,wt	-	-	-	++
TRAP/P3x	-	-	-	++
muATAC/P3x (B11)	-	-	-	++
3'c-myc/hATACR/L-Zellen (Klon 5)	-	-	-	-
L-Zellen wt	-	-	-	-
TRAP/L-Zellen	-	-	-	-
hATACR/300-19	-	-	-	++
300-19 wt	-	-	-	++

Tab. 2 Durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Transfektanten und Wildtypzellen.

Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit den monoklonalen hATACR-Antikörpern und durchflusszytometrische Analyse. Sekundärreagenz: FITC-konjugiertes F(ab)₂ Ziege anti-Maus-IgG und IgM (1:100).

++ starke Färbung, + schwache Färbung, - keine Färbung

Aufgrund dieser sehr widersprüchlichen Ergebnisse wurden zunächst alle Transfektanten einer genaueren Prüfung hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression unterzogen. Es bestand die Möglichkeit, dass die Methode der intrazellulären Durchflusszytometrie-Färbung als Screeningmethode für die Transfektanten ungeeignet ist. Außerdem war es möglich, dass bereits die P3x-Mutterlinie (Myelomzelllinie aus Balb/c-Mäusen) den hATACR exprimiert, womit sich die Reaktivität einiger der mAKs mit den untransfizierten Zellen erklären ließe. Als eine weitere Möglichkeit könnten die mAKs kreuzreaktiv ein oder mehrere Epitope eines anderen Moleküls erkennen, das auf den unterschiedlichen Linien exprimiert wird. Darüber hinaus kann sich die 3D-Struktur des 7TMRs ändern, so dass der Rezeptor möglicherweise in den diversen Transfektanten unterschiedlich vorliegt. Zur Klärung dieser Fragen wurden die Transfektanten mit Hilfe des Northern Blots, des Western Blots und erneuten Durchflusszytometrie-Messungen genauer analysiert.

3.2.1.2. Vergleich der verschiedenen Transfektanten hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression mithilfe unterschiedlicher Methoden

Zur genaueren Untersuchung des ATAC-Rezeptor-Expressionsniveaus der verschiedenen Transfektanten wurden die Transfektanten und die untransfizierten Mutterzellen zunächst mit

den beiden hATACR-spezifischen polyklonalen Immunsereen aus Maus und Kaninchen immunfluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Sowohl das Immunsereum von der Maus als auch das vom Kaninchen erkannte jeweils spezifisch *alle* hATACR-Transfektanten in der Durchflusszytometrie, wobei die Färbung mit dem Maus-Immunsereum heller war als die mit dem Kaninchen-Immunsereum.

Mit den Wildtypzellen zeigte *keines* der beiden hATACR-spezifischen Antiseren eine Reaktivität. Als Negativkontrollen dienten daneben Immunfluoreszenzfärbungen mit den Präimmunsereen und mit einem irrelevanten Kontrollantikörper (MOPC-21). In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten weder die Transfektanten noch die untransfizierten Mutterzellen eine Reaktivität mit den Präimmunsereen bzw. mit dem mAk MOPC-21.

Abbildung 6 zeigt die Reaktivität der vier verschiedenen hATACR-Transfektanten mit dem polyklonalen Maus-Immunsereum.

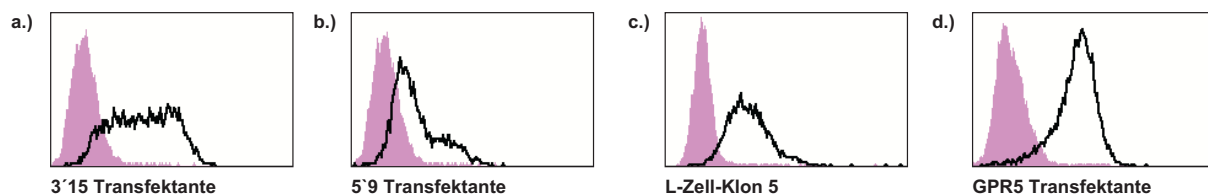


Abb. 6 **Reaktivität der hATACR-Transfektanten mit dem polyklonalen hATACR-spezifischen Maus-Immunsereum**

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung der hATACR-Transfektanten und der nichttransfizierten Wildtypzellen (dunkel hinterlegt) mit dem polyklonalen hATACR-spezifischen Maus-Antisereum (1:100) und FACS-Analyse. Sekundärreagenz: FITC-konjugiertes F(ab)₂-Ziege-anti-Maus-IgG und IgM (1:100). (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

- a.) 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante („3'15 Transfektante“)
- b.) 5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante („5'9 Transfektante“)
- c.) 3'c-myc/hATACR/L-Zell-Transfektante („L-Zell-Klon 5“)
- d.) hATACR/300-19-Transfektante („GPR5 Transfektante“)

Ein Vergleich der Transfektante 3'c-myc/hATACR/P3x mit der hATACR/300-19-Transfektante mit Hilfe des **Northern Blots** (durchgeführt von Frau Dr. B. Dorner) zeigte einen höheren hATACR-mRNA Gehalt bei der 3'c-myc/hATACR/P3x als bei der hATACR/300-19-Transfektante (Daten nicht gezeigt).

Bei der **durchflusszytometrischen** Analyse (s.o.) des Proteingehaltes zeigte die hATACR/300-19-Transfektante („GPR5-Transfektante“) die höchste Rezeptorexpression, die über der Signalintensität der L-Zell-Transfektante lag (bestimmt anhand der Färbung mit dem spezifischen Maus-Immunsereum). Die Oberflächen-Rezeptorexpression der 3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante war in dieser Messung ebenfalls hoch, schwankte jedoch –

wie oben ausgeführt – erheblich. Das niedrigste Expressionsniveau wies die 5'-myc/hATACR/P3x-Transfektante auf.

Schließlich wurde der hATACR-Proteingehalt noch mit Hilfe der **Immunpräzipitation** bestimmt (siehe 3.2.1.2.1.): Die 5'-myc/hATACR/P3x-Transfektante, deren Rezeptorexpression – mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt –, die schwächste von allen Transfektanten war, zeigte in der IP zusammen mit der L-Zell-Transfektante ein deutlicheres Signal als die 3'-myc/hATACR/P3x- und die hATACR/300-19-Transfektante, die in dieser Methode den geringsten hATACR-Proteingehalt von allen untersuchten Transfektanten aufwies.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der verschiedenen Experimente dargestellt.

	Expressionsniveau der hATACR-Transfektanten
FACS (Oberflächenexpression) Maus-IS (1:100)	hATACR/300-19 > 3'-myc/hATACR/L-Zellen ≈ 3'-myc/hATACR/P3x > 5'-myc/hATACR/P3x
Western Blot (IP mit 6F8 sup) (Proteingehalt im Gesamtzell-Lysat)	5'-myc/hATACR/P3x ≈ 3'-myc/hATACR/L-Zellen > 3'-myc/hATACR/P3x > hATACR/300-19
Northern Blot (mRNA-Gehalt)	3'-myc/hATACR/P3x > hATACR/300-19 (andere Transfektanten wurden nicht getestet)

Tab. 3 Vergleich der vier hATACR-Transfektanten hinsichtlich ihres Expressionsniveaus.

3.2.1.2.1. Immunpräzipitation des nativen hATACR-Proteins aus Lysaten der verschiedenen Transfektanten

Die Fähigkeit der mAKs, das native hATACR-Protein der Transfektanten zu erkennen, wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation untersucht. Hierzu wurde ein Zell-Lysat der hATACR-Transfektante 3'-myc/hATACR/P3x mit den vier Überständen 6F8, 5C5, 1F1, 6D2 sowie dem aufgereinigten Antikörper 7G11 und Protein-G-Sepharose inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Präzipitation mit dem c-myc-spezifischen Antikörper. Als Negativkontrolle wurde eine IP aus Lysaten der nichttransfizierten Mutterzelllinien durchgeführt. Die Präzipitate wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mittels semi-dry-Elektroblot mit dem Kaninchen-Antiserum inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem biotinylierten Ziegen-anti-Kaninchen-IgG und einem alkalische Phosphatase/Avidin-Konjugat detektiert. Nach Präzipitation des ATAC-Rezeptors mit den monoklonalen hATACR-spezifischen Antikörpern sowie dem c-myc-Antikörper als Positivkontrolle und nachfolgender Detektion im Immunoblot mit Kaninchen-Antiserum konnten mehrere spezifische Banden nachgewiesen werden.

Mit dem 6F8-Überstand sowie dem aufgereinigten mAk 7G11 konnte eine deutliche Immunpräzipitation eines 30-35 kD Proteins erzielt werden, was mit dem erwarteten Molekulargewicht des hATAC-Rezeptors in Übereinstimmung ist. Mit den 6D2- und 5C5-Überständen konnte eine schwache Immunpräzipitation, während mit 1F1 keine Immunpräzipitation erzielt werden konnte. Mit dem Überstand 6F8 konnte in allen vier durchgeführten Experimenten eine deutliche Immunpräzipitation erreicht werden. Somit konnte mit 6F8 ein Hybridomüberstand etabliert werden, der zuverlässig die Fähigkeit zur Immunpräzipitation des nativen hATACR-Proteins und zur Detektion des denaturierten hATACR-Proteins besitzt.

Um eine bessere Auftrennung des hATACR-Proteins zu erzielen, wurde für die folgende Immunpräzipitation ein großes Gel verwendet: Es wurde eine Immunpräzipitation mit Lysaten von allen vorhandenen hATACR-Transfektanten (je 10×10^6 Zellen) durchgeführt und der 6F8-Überstand, der im Vorexperiment die besten Ergebnisse geliefert hatte, zur Präzipitation verwendet (10 ml). Der Vergleich der verschiedenen Transfektanten (3'-myc/hATACR/P3x und 5'-myc/hATACR/P3x vs. P3x-Wildtyp, hATACR/300-19 vs. 300-19-Wildtyp, 3'-myc/hATACR/L-Zellen vs. L-Zellen-Wildtyp) zeigte, dass der 6F8-Überstand in der Lage ist, in *allen* Transfektanten ein spezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von 30 bis 35 kD zu präzipitieren. Das MW unterschied sich geringfügig zwischen den verschiedenen Transfektanten, was möglicherweise auf die unterschiedliche Glykosylierung der Transfektanten zurückzuführen ist. In den Negativkontrollen (IP aus dem Lysat der untransfizierten Wildtypzellen) wurde in keiner der durchgeführten IPs ein hATACR-spezifisches Signal detektiert. Abb. 7 zeigt die Fähigkeit des 6F8-Hybridomüberstands zur Immunpräzipitation des hATAC-Rezeptors aus drei verschiedenen Transfektanten (3'-myc/hATACR/P3x, 5'-myc/hATACR/P3x, hATACR/300-19, entsprechend den Spuren 2, 4 und 5).

hATACR →
(30-35 kDa)

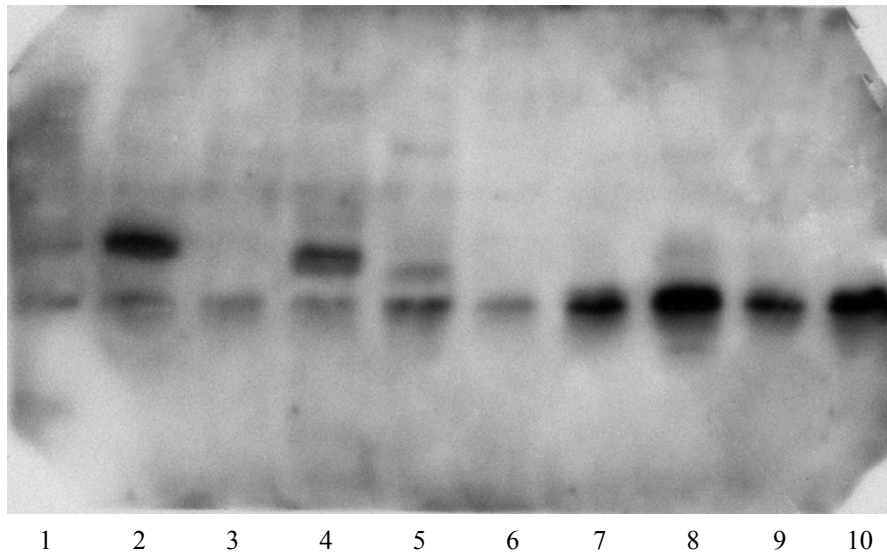


Abb. 7 Immunoblot, der die Fähigkeit des mAk 6F8 zur Immunpräzipitation des nativen hATACR-Proteins und zur Detektion des denaturierten hATACR-Proteins zeigt.

hATACR aus Lysaten von drei verschiedenen Transfektanten wurde mit dem Hybridomüberstand 6F8 präzipitiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit Kaninchenantiserum gegen hATACR nachgewiesen.

- Spur 1: Marker
- Spur 2: 6F8 und 5'-myc/hATACR/P3x
- Spur 3: 6F8 und P3x wt-Zellen
- Spur 4: 6F8 und 3'-myc/hATACR/P3x
- Spur 5: 6F8 und hATACR/300-19
- Spur 6: 6F8 und 300-19 wt-Zellen
- Spur 7: Preclearing, PBMC unstimuliert
- Spur 8: Preclearing, PBMC, P+I stimuliert
- Spur 9: Preclearing, NTC unstimuliert
- Spur 10: Preclearing, NTC, stimuliert mit P+I

3.2.1.2.2. Immunzytochemischer Nachweis des hATACR-Proteins aus den verschiedenen Transfektanten

Zur weiteren Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurden die transfizierten Zelllinien (3'-myc/hATACR/P3x, 5'-myc/hATACR/P3x, 3'-myc/hATACR/L-Zellen, hATACR/300-19) und die entsprechenden Wildtypzellen mit Hilfe der Zytocentrifuge auf Objektträger aufzentrifugiert und nach Aceton- bzw. Formaldehydfixierung mit der APAAP Methode angefärbt. Mit dieser Methode konnte keine spezifische Färbung erzielt werden, alle Antikörper färbten sowohl die Transfektanten als auch die untransfizierten Wildtyp-Zellen, wobei stets die große Mehrzahl der Zellen angefärbt war. Die Intensität der Färbung der Transfektanten war geringfügig stärker als die der Wildtypzellen. Zwischen einer Fixierung mit Aceton und einer Fixierung mit Formaldehyd war kein Unterschied feststellbar. Auch durch eine

Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton konnte keine spezifische Färbung erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3. Expression des humanen ATAC-Rezeptors in vivo

3.3.1. Histologische Untersuchung von Gefrierschnitten verschiedener Gewebe mittels der APAAP Methode

Zur Untersuchung der Expression des ATAC-Rezeptors in vivo wurden zunächst Gefrierschnitte von verschiedenen Geweben angefertigt. Es wurden diejenigen Gewebe ausgewählt, die nach den bislang publizierten Daten eine Rezeptorexpression aufweisen: Mittels Northern Blot-Analyse fanden Yoshida et. al. (1998) das stärkste Signal in der Plazenta und eine deutlich geringere Expression in Milz, Thymus und PBMCs, während B-Zellen keine Rezeptorexpression aufwiesen.

Von der *Plazenta* wurden die choriale Deckplatte, die Basalplatte, sowie ein Gewebestück aus dem medialen Bereich untersucht. Die verschiedenen Gewebeproben wurden jeweils mit den Antikörpern 6D2, 5C5, und 7G11 angefärbt. Die APAAP Methode erwies sich jedoch als für dieses Organ nicht geeignet, vermutlich da in der Plazenta eine sehr hohe endogene alkalische Phosphatase-Aktivität besteht, die sich durch Levamisol nicht blockieren lässt.

Die Gefrierschnitte der *Tonsille* wurden ebenfalls mit Hilfe der APAAP-Methode angefärbt. Die Färbungen erfolgten zunächst mit den nicht aufgereinigten Antikörpern (in verschiedenen Verdünnungsstufen von unverdünnt bis 1:160), später mit den aufgereinigten mAKs. Zwei der Antikörper färbten einzelne Zellen an, die über ein großes Zytoplasma mit einem exzentrisch gelegenen Kern verfügten. Hierbei handelt es sich jedoch vermutlich um eine unspezifische Färbung einzelner Plasmazellen, wie man es auch bei anderen monoklonalen Antikörpern häufiger finden kann (persönliche Mitteilung von Dr. Anagnostopoulos, FU Berlin, Pathologie). Auch die *Milz*-Schnitte wurden mit der APAAP-Methode angefärbt. Mit den Antikörpern 5C5 und 6D2 ergab sich eine Anfärbung von streifigen, filiformen Strukturen, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Es könnte sich hierbei um eine unspezifische Anfärbung von faserigen Strukturen (elastische Fasern?) handeln. (Daten nicht gezeigt).

3.3.2. Immunhistochemische Analyse von Zytozentrifugenpräparaten von primären Zellen

Nachdem keine der histologischen Untersuchungen der verschiedenen *Gewebe* zu einem eindeutigen Ergebnis geführt hatte, wurden zusätzlich Zytozentrifugenpräparate *von primären Zellen* angefertigt und mit den verschiedenen mAks angefärbt (Endkonzentration 10 µg/ml). Es wurden NTCs und PBMCs, die entweder 48 h mit PMA+Ionomycin stimuliert, oder ruhend waren und Monozyten (24h LPS-stimuliert oder ruhend) auf Objektträger aufzentrifugiert und mit Hilfe der APAAP-Methode angefärbt. Alle Zellen wurden jeweils entweder mit Aceton oder mit Formaldehyd fixiert. Hierbei ergab sich eine unspezifische Anfärbung aller Präparate ohne Unterschied ob es sich um transfizierte Zellen oder um Wildtypzellen handelte oder ob die Zellen ruhend oder stimuliert waren. Zwischen einer Fixierung mit Aceton und Formaldehyd bestand kein Unterschied.

Die in 3.2.1.2.2., 3.3.1 und 3.3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die mAks vermutlich nicht geeignet sind, hATACR mittels histologischem Nachweis darzustellen.

3.3.3. Durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener primärer Zellen (NTCs, PBMCs, Monozyten)

Zur weiteren Untersuchung der Frage, welche Zellen *in vivo* den hATACR exprimieren und durch welche Stimuli die Expression *in vitro* induzierbar ist, wurden im Rahmen von Zeitkinetik-Experimenten primäre Zellen aus dem peripheren Blut mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf ihre hATACR-Expression untersucht.

Zur Analyse der Rezeptor-Expression wurden daher zunächst periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aufgereinigt und daraus die T-Zellen mittels Nylonwolle und die Monozyten durch eine PMBC-Adhärenz isoliert.

Da bekannt ist, dass die Expression der Chemokinrezeptoren stark vom Aktivierungszustand der jeweiligen Zelle abhängig ist, wurden die Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen kultiviert, mit den monoklonalen Antikörpern immunfluoreszenzmarkiert und die Expression des hATACR-Moleküls in bestimmten Zeitabständen durchflusszytometrisch analysiert. Zur genauen Erfassung der Kinetik der Rezeptorexpression erfolgten bei den ersten durchflusszytometrischen Analysen die Messungen in engen Zeitabständen.

Die folgenden Agenzien wurden zur Stimulation der verschiedenen Zellpopulationen verwendet:

a.) *PMA* (33 ng/ml) + *Ionomycin* (200 ng/ml) für die Stimulation von PBMCs und NTCs.

Durchflusszytometrische Analyse nach den Zeitpunkten 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h, 48 h.

b.) *PHA* (1,5 µg/ml) + *IL-2* (50 U/ml) für die Stimulation von PBMCs und NTCs;

Die Zellen wurden zunächst mit *PHA* alleine stimuliert, nach 3 d wurden 50 U/ml *IL-2* der Kultur zugegeben, nach 7 d erfolgte eine Restimulation mit *PHA* und *IL-2*.

Durchflusszytometrische Analyse nach den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d, 7 d, 8 d, 9 d, 10 d, 11 d, 12 d, 13 d und 14 d.

c.) *LPS* (1 mg/ml) für die Stimulation der Monozyten, Durchflusszytometrische Analyse nach

24 h.

Die T-Zellen und die PBMCs wurden jeweils auf Mikrotiterplatten in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml stimuliert. Die NTC setzen sich zusammen aus T-Zellen (durchschnittlich 85% $CD4^+$ und 15% $CD8^+$) und NK-Zellen (zwischen 3-25%, hohe Spendervariabilität, Müller 1998)

Der Erfolg der Stimulierung wurde jeweils durch die Analyse der Oberflächenexpression bekannter, gut charakterisierter Zellaktivierungsantigene (*CD25*, *CD69*, *ICOS*, *TRAP*) bei jeder Messung überprüft. Außerdem wurden neben den stimulierten Zellen immer auch die dazugehörigen ruhenden Zellen gleichzeitig analysiert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse von PBMCs sind im Scattergramm (Darstellung der Zellen anhand ihrer Streulichteigenschaften, Vorwärtsstreuung~Größe, Seitwärtsstreuung~Granularität) zwei unterschiedliche Zellpopulationen erkennbar: Die kleineren und weniger granulierten Lymphozyten und NK-Zellen sowie die größeren und stärker granulierten Monozyten. Zelltrümmer, Erythrozyten und andere Partikel mit einem Durchmesser $< 7,7 \mu\text{m}$ wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt. Im Scattergramm der NTCs fehlen die Monozyten, da sie durch die Isolierung gemeinsam mit den B-Lymphozyten entfernt wurden. In der Histogramm Darstellung der ungefärbten bzw. mit einer Isotypkontrolle angefärbten PBMCs ist ein Doppelgipfel erkennbar, der durch die höhere Eigenfluoreszenz der Monozyten zustande kommt, die den zweiten Gipfel mit der höheren Fluoreszenz bewirken, während die Lymphozyten den ersten Gipfel ausmachen.

Die unterschiedlichen Zellpopulationen (PBMC, NTC, Monozyten) wurden sowohl ruhend als auch nach unterschiedlich langer Stimulation mit *PHA*, *P+I* bzw. *LPS* mit den mAKs 5C5, 1F1, 6D2, 7G11 und dem Überstand 6F8 immunfluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Der mAk **7G11** reagierte mit keiner der untersuchten unterschiedlichen Zellpopulationen. Der Hybridomüberstand **6F8**, der zwar in der IP sicher in der Lage ist, spezifisch den hATACR zu erkennen, erwies sich – wie weiter oben bereits erwähnt – als nicht geeignet für durchflusszytometrische Untersuchungen.

Mit den mAks **1F1** und **6D2** konnten ebenfalls keine spezifischen, reproduzierbaren Färbungen erzielt werden (Anfärbung von Monozyten, die jedoch nicht in allen Messungen bestätigt werden konnte, *keine* Reaktivität mit PBMCs [bei elektronischer Eingrenzung auf die Lymphozytenpopulation und NTCs], Daten nicht gezeigt).

Daher konzentriert sich die folgende Darstellung der Ergebnisse auf den mAk **5C5**, der für die Technik der Durchflusszytometrie geeignet erscheint:

Die stärkste Reaktivität konnte in der Durchflusszytometrie mit dem *mAk 5C5* und 48 h P+I stimulierten NTCs und PBMCs beobachtet werden. Bereits ruhende NTCs und PBMCs waren mit dem mAk **5C5** reaktiv. Durch eine Stimulation der Zellen mit P+I konnte jedoch eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression gesehen werden, mit einer maximalen Expressionsstärke nach 48 h (Abb. 8).

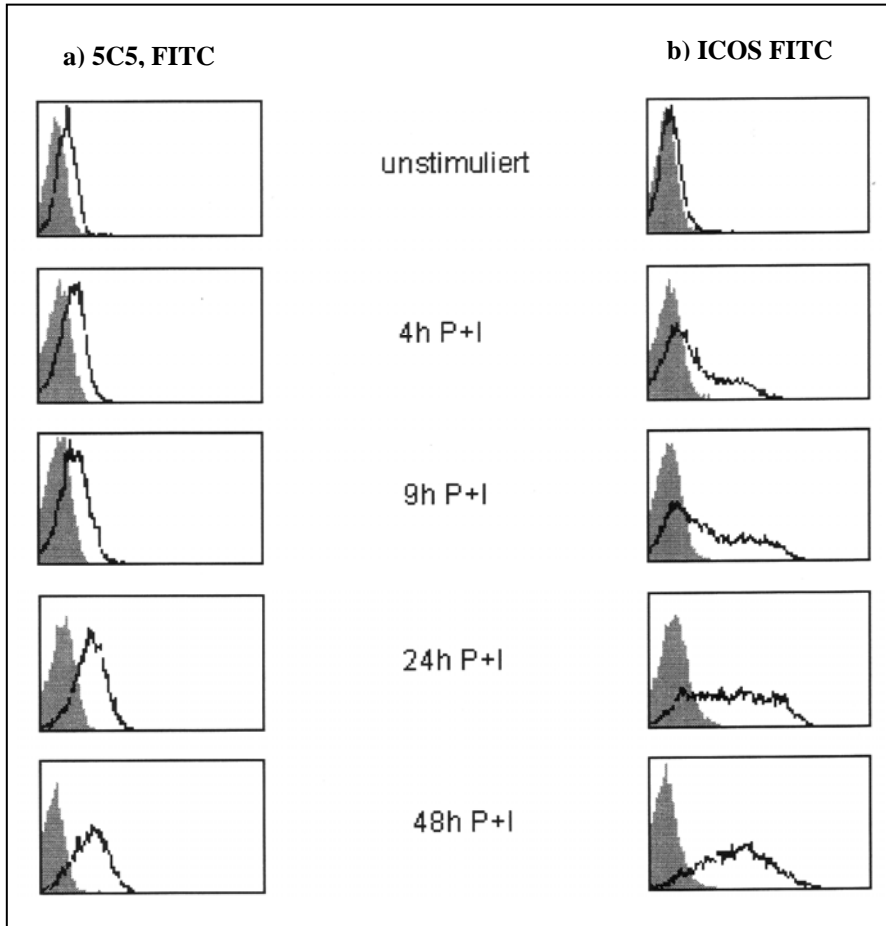


Abb. 8: Induktion der Rezeptorexpression auf humanen NTCs nach Stimulation mit PMA+Ionomycin

Dunkel hinterlegt ist jeweils die Isotypkontrolle. (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

- a.) NTCs ruhend und nach Stimulation mit PMA+Ionomycin. Nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem mAk 5C5 und durchflusszytometrischer Analyse zeigt sich eine Heraufregulation der Rezeptorexpression nach Stimulation mit P+I
- b.) Kontrolle der Aktivierung durch Nachweis der ICOS Expression.

Dieses Ergebnis einer Rezeptorexpression durch aktivierte T-Zellen konnte durch die Durchflusszytometrie-Analyse von PBMCs bestätigt werden: Auch hier zeigte sich eine Reaktivität von ruhenden PBMCs mit dem mAk 5C5, die nach Stimulation mit P+I – wie auch bei den NTCs – deutlich zunahm (Abb. 9).

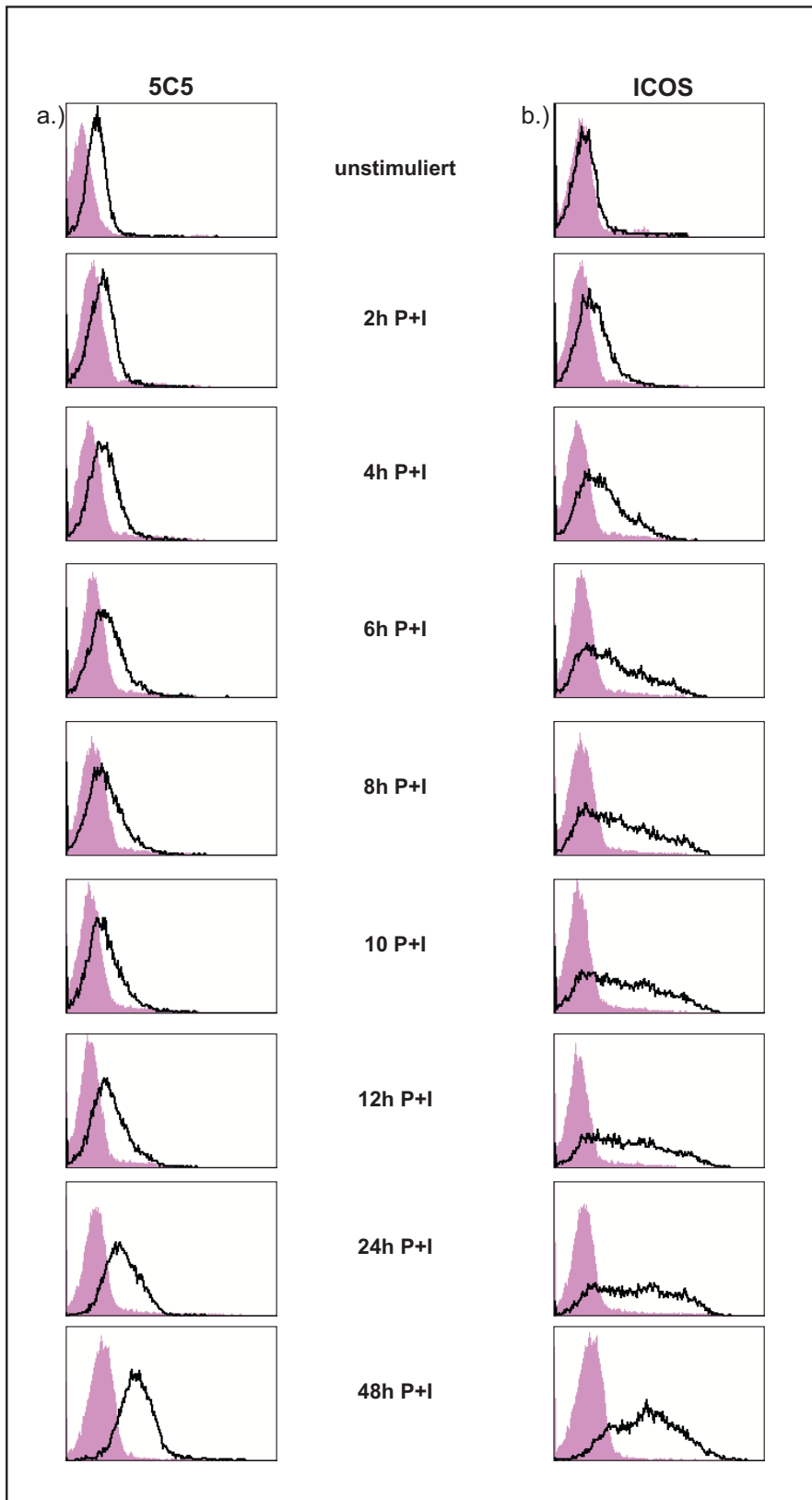


Abb. 9: Heraufregulation der hATACR-Expression auf PBMCs nach Stimulation mit PMA+Ionomycin

a.) PBMCs ruhend und nach unterschiedlich langer Aktivierung mit PMA+Ionomycin. Immunfluoreszenzfärbung mit dem mAk 5C5 und durchflusszytometrische Analyse zu den angegebenen Zeitpunkten.

b.) Kontrolle der Aktivierung durch Nachweis der ICOS Expression. (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Nach Stimulation mit PHA zeigte sich innerhalb der 14 tägigen Stimulationsdauer eine geringe Zunahme der Rezeptorexpression, insgesamt war die Expression jedoch geringer als nach einer Stimulation mit P+I (Abb. 10).

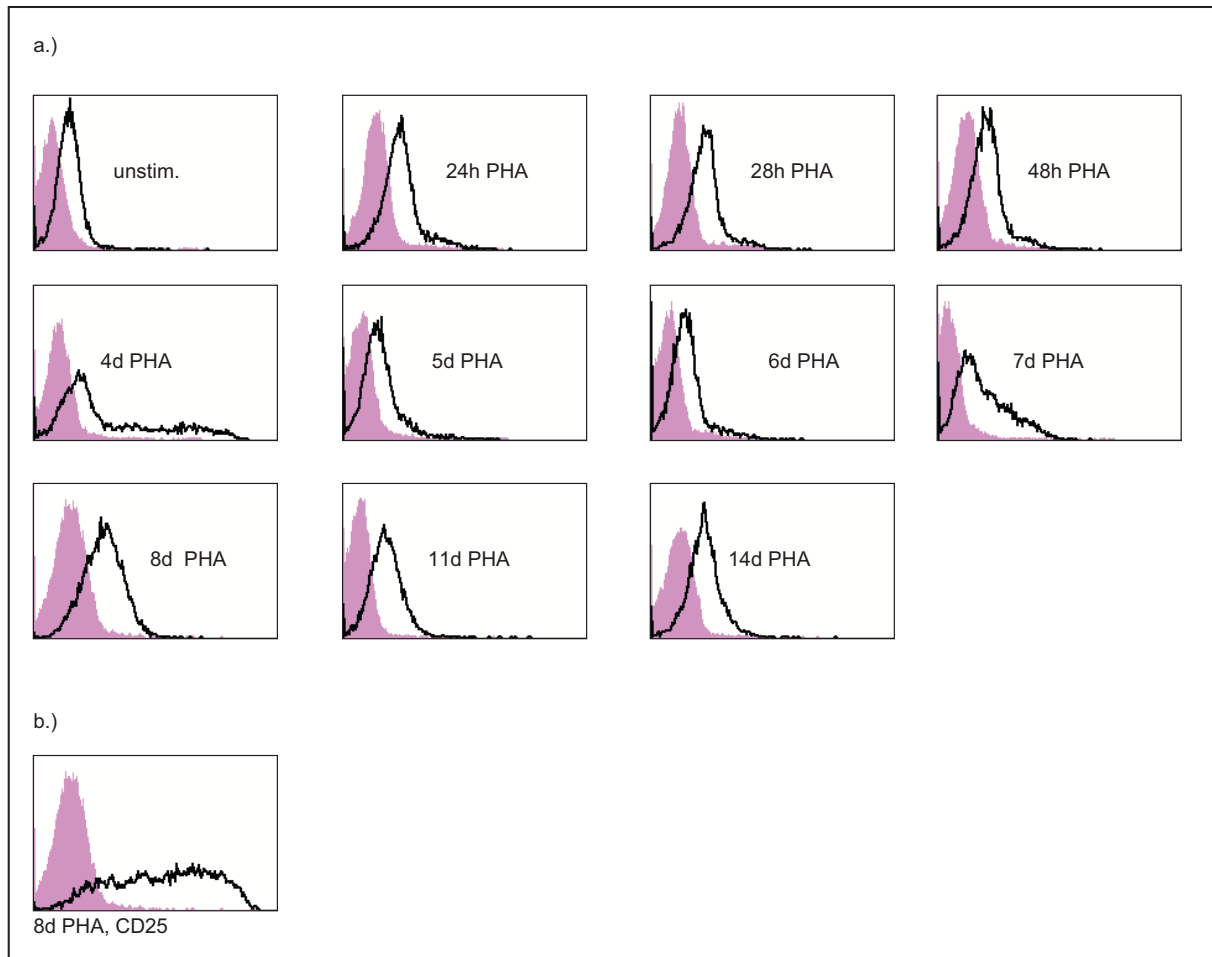


Abb. 10: hATACR-Expression auf ruhenden und mit PHA stimulierten PBMCs

- a.) PBMCs wurden mit PHA stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem mAk 5C5 (offene Linie) oder mit einem Isotypkontrollantikörper (dunkel hinterlegt) durchflusszytometrisch analysiert.
- b.) Kontrolle der Aktivierung durch Nachweis der CD25 Expression auf PBMCs nach Stimulation mit PHA für 8d.
(x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Im weiteren wurden zusätzlich zu den PBMCs auch NTCs mit PHA stimuliert (Zusatz von IL-2 nach 3 Tagen, Restimulation mit PHA und IL-2 nach 7 Tagen) und nach Färbung mit dem mAk 5C5 durchflusszytometrisch untersucht. Auch hier zeigte sich allenfalls eine geringe Zunahme der Rezeptorexpression, wobei die Färbeintensität – wie auch schon bei den PBMCs – geringer war als nach einer Stimulation mit P+I (Abb. 11).

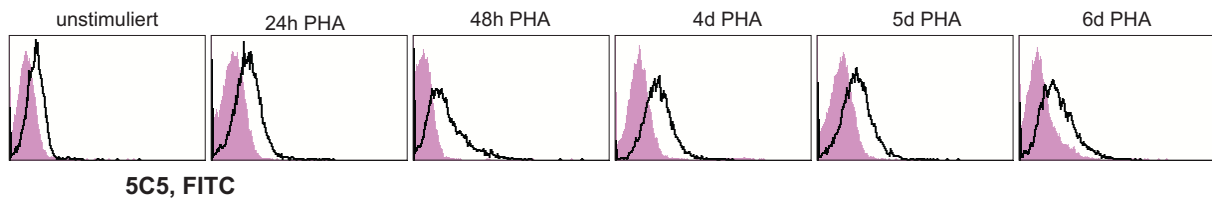


Abb. 11: hATACR-Expression auf ruhenden und mit PHA stimulierten NTCs
 Immunfluoreszenzfärbung mit dem mAk 5C5 und durchflusszytometrische Analyse zu den angegebenen Zeitpunkten (offene Linie). Dunkel hinterlegt ist jeweils die Färbung mit dem Isotypkontrollantikörper dargestellt. (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Die Reaktivität des mAk 5C5 mit ruhenden oder stimulierten PBMCs war bei elektronischer Eingrenzung auf die Lymphozytenpopulation mit seiner Reaktivität mit NTCs vergleichbar. Nach 48h Stimulation mit PHA oder PMA/Ionomycin war kein wesentlicher Unterschied zwischen NTCs oder PBMCs in der Färbeintensität zu detektieren.

Die oben dargestellten Ergebnisse konnten jeweils in allen drei untersuchten, von unterschiedlichen Spendern stammenden Buffy coats reproduziert werden.

Überraschenderweise fiel bei der Analyse der PBMCs – wie in Abb. 12 erkennbar wird – eine Anfärbung der Monozytenpopulation durch 5C5 auf, die im Scattergramm und im Histogramm aufgrund ihrer im Vergleich zu Lymphozyten höheren Granularität und Größe sowie ihrer höheren Eigenfluoreszenz identifiziert werden kann.

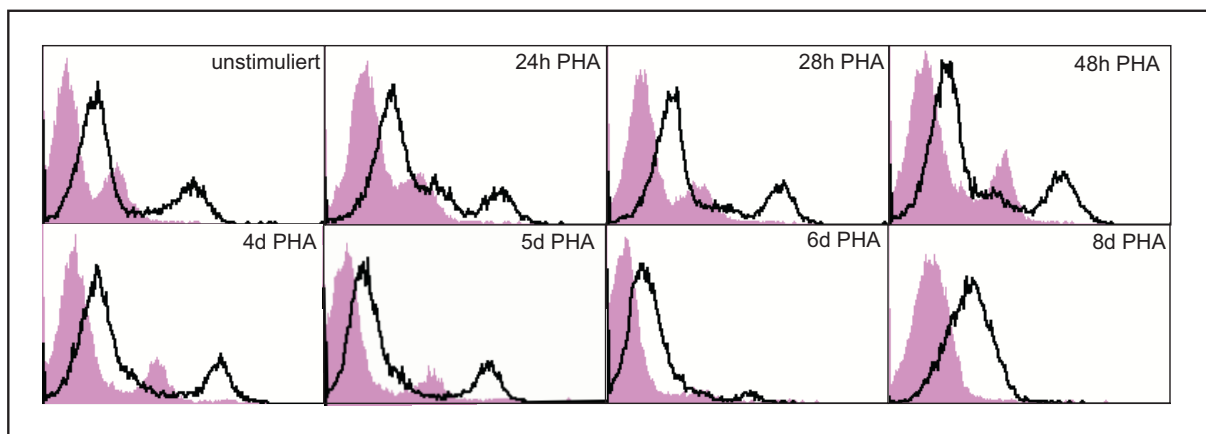


Abb. 12: Durchflusszytometrische Färbung von unstimulierten und PHA stimulierten PBMCs mit dem mAk 5C5 und elektronischer Eingrenzung auf Lymphozyten und Monozyten.
 Ruhende und mit PHA stimulierte PBMCs wurden mit dem mAk 5C5 immunfluoreszenzmarkiert und zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert (offene Linie). Dunkel hinterlegt dargestellt ist die Färbung mit einem Isotypkontrollantikörper. (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Die folgende Abbildung zeigt eine durchflusszytometrische Färbung von unstimulierten PBMCs mit dem mAk 5C5 bei elektronischer Eingrenzung auf die Monozytenpopulation innerhalb der PBMCs (Abb. 13):

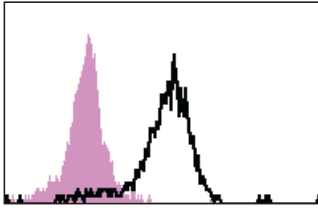


Abb. 13: ruhende PBMCs nach Anfärbung mit dem mAk 5C5 und durchflusszytometrischer Analyse. Elektronische Eingrenzung auf die Monozytenpopulation innerhalb der PBMCs
Dunkel hinterlegt: Färbung mit dem Isotypkontrollantikörper. (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden zusätzlich Monozyten, die aus PBMCs durch Adhärenz gewonnen worden waren mit den mAks immunfluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch analysiert. Das Monozyten-Gate wurde auf der Grundlage der CD14 positiven Zellen, die die geeigneten Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht-Charakteristika aufwiesen, gewählt. Der prozentuale Anteil der Monozyten in den PBMC Adhärenz-Kulturen wurde jeweils durchflusszytometrisch durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD14 bestimmt und lag in der Regel bei 90-95%. Alle zu analysierenden Zellen wurden jeweils vor jeder Immunfluoreszenzfärbung für 15 min. mit Endobulin (humanem Immunglobulin) in einer Konzentration von 2 mg/ml inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern über F_c -Rezeptoren zu reduzieren. Als Negativkontrolle (Isotypkontrolle) diente der unspezifische mAk MOPC-21 (IgG1) in einer Konzentration von 40 μ g/ml (entsprechend der höchsten verwendeten Ak-Konzentration). Bei den Monozyten wurden außer dieser Isotypkontrolle als zusätzliche Negativkontrollen weitere Antigene angefärbt, von denen bekannt ist, dass sie von Monozyten nicht exprimiert werden (CD1a, CD69, TRAP). Mit keinem dieser Antikörper wurde eine Reaktivität beobachtet, die Färbeintensität entsprach der Isotypkontrolle, außer bei CD1a, mit dem eine im Vergleich zur Isotypkontrolle ausgeprägtere unspezifische Färbung zu erkennen war, wobei die Intensität der Färbung immer noch deutlich geringer war im Vergleich zur Färbung mit dem mAk 5C5.

Mit dem mAk 5C5 konnte reproduzierbar eine deutliche Reaktivität mit Monozyten beobachtet werden (und zwar sowohl mit den über Plastikadhärenz gewonnenen, 90-95% reinen Monozyten als auch mit der Monozytenpopulation innerhalb der PBMCs). Durch eine Stimulation der Monozyten mit LPS kam es zu keiner weiteren Zunahme der Rezeptorexpression. Ebenfalls waren zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (2/3/4/5 Tage in Kultur) keine Unterschiede in der Färbeintensität festzustellen (Abb. 14).

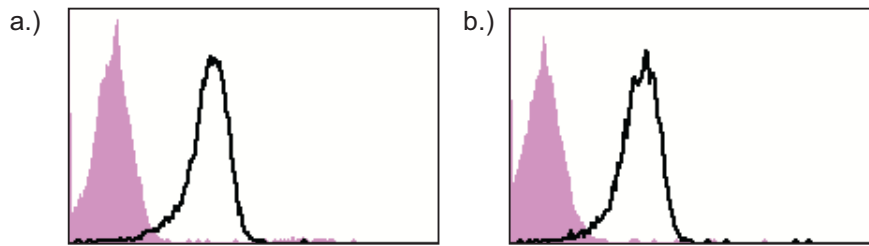


Abb. 14: Monozyten unstimuliert und nach 24h LPS-Stimulation, Immunfluoreszenzfärbung mit dem mAk 5C5
 Repräsentativ für 4 unabhängige Experimente mit Monozyten von unterschiedlichen Spendern. Dunkel hinterlegt dargestellt ist die Färbung mit dem Isotypkontrollantikörper.
 a.) Monozyten unstimuliert, 2d in Kultur
 b.) Monozyten nach 24h LPS-Stimulation, 2d in Kultur
 (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der beobachteten Reaktivität des Antikörpers mit Monozyten und T-Zellen wurden die Zellen zusätzlich mit dem polyklonalen hATACR-spezifischen Maus-Immunsereum angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei konnten die bisherigen Ergebnisse mit dem mAk 5C5 bestätigt werden: Auch mit dem Immunsereum konnte eine Anfärbung von NTCs (Abb. 15a) und PBMCs (nicht gezeigt) erzielt werden, die im Vergleich zur Färbung mit dem mAk in ihrer Intensität schwächer war, wobei sich auch hier eine Zunahme der Expression nach Stimulierung der Zellen mit P+I zeigte. Allerdings konnte im Gegensatz zum mAk 5C5 keine Reaktivität des Immunsereums mit (unstimulierten) PBMCs detektiert werden (nicht gezeigt). Die Monozytenfärbungen mit dem polyklonalen Maus-Immunsereum bestätigen ebenfalls die Färbungen mit dem mAk 5C5. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen ruhenden Zellen und einer Stimulation mit LPS erkennen (Abb. 15b und c).

Mit dem hATACR-spezifischen Kaninchen-Immunsereum, das bereits auf Transfektanten in der Farbeintensität deutlich geringer als das Maus-Immunsereum war, konnte keine Reaktivität auf NTCs und PBMCs gesehen werden. Lediglich bei der Durchflusszytometrie-Analyse der Monozyten zeigte sich sowohl mit dem Antiserum als auch gleichermaßen mit dem als Negativkontrolle eingesetzten Prä-Immunsereum eine Anfärbung (nicht gezeigt).

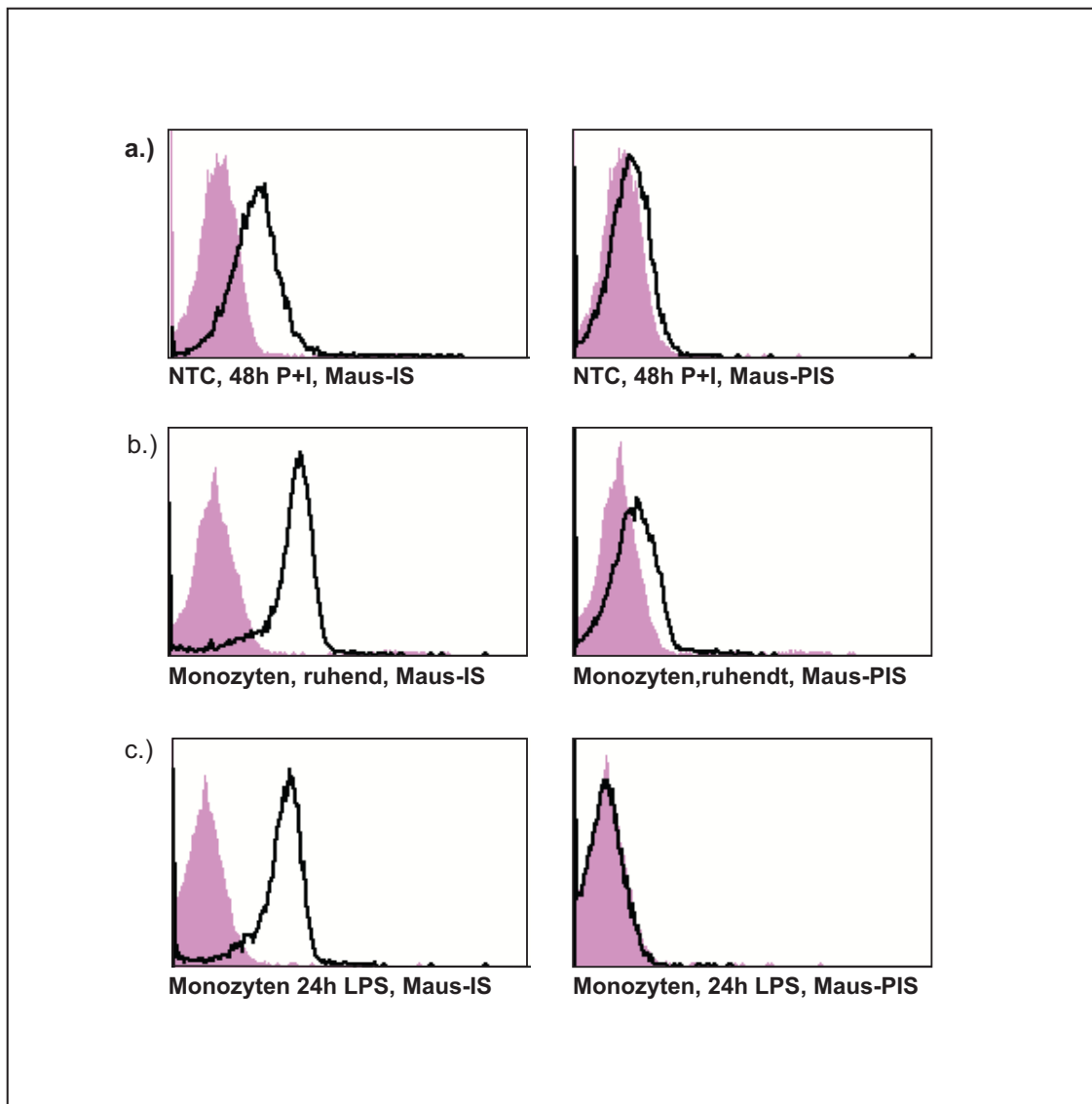


Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse von verschiedenen primären Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem polyklonalen hATACR-spezifischen Maus-Immunsrum (IS) bzw. mit dem Präimmunsrum (PIS)
 Dunkel hinterlegt ist die Färbung mit dem Isotypkontrollantikörper. In der linken Spalte ist jeweils die Färbung mit dem Maus-IS und in der rechten Spalte die Färbung mit dem Maus-PIS gezeigt. (x-Achse: log MFI; y-Achse: Zellzahl)
 a.) NTCs nach 48h Stimulation mit P+I
 b.) Monozyten, ruhend
 c.) Monozyten nach 24h Stimulation mit LPS

Die Expression durch T-Zellen sowie durch Monozyten konnte durch vier verschiedene Untersuchungen bestätigt werden (Analyse von vier unterschiedlichen buffy coats).

3.3.4. Immunpräzipitation von primären Zellen (NTCs, PBMCs, Monozyten)

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sollten im folgenden durch eine zweite Methode bestätigt werden: Zur weiteren Klärung der Frage, von welchen Zellen der hATAC-Rezeptor in vivo exprimiert wird, wurden humane T-Zellen, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes sowie Monozyten mit PMA+Iono für 48 h bzw. mit LPS für 24 h (Monozyten) aktiviert, da mit dieser Stimulation in der Durchflusszytometrie die stärkste Reaktivität beobachtet worden war (siehe unten). Aus dem Zellsediment der aktivierten sowie der ruhenden Zellen (jeweils 15×10^6 NTCs/PBMCs bzw. 50×10^6 NTCs/PBMCs und 20×10^6 Monozyten für ein großes Gel) wurden Lysate angefertigt, die einer Immunpräzipitation unterzogen wurden. Für die IP wurden die hATACR-spezifischen mAbs 6F8 und 7G11 verwendet, die, wie unter 3.2.1.2.1. beschrieben, in der Lage sind, den hATACR zu präzipitieren. Als Positivkontrolle diente ein c-myc-spezifischer Antikörper. Die Immunpräzipitate wurden unter reduzierenden Bedingungen (in Gegenwart von 0,1 M Dithiothreitol) in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch einen Immunoblot visualisiert, in dem das spezifische Kaninchenantiserum zur Immunodetektion verwendet wurde.

Mit dem 6F8 Überstand konnte bei den 48 h mit PMA+Ionomycin stimulierten NTCs ein schwaches Signal detektiert werden, das weder bei den ruhenden NTC noch bei den PBMCs und Monozyten vorhanden war. Problematisch war allerdings das in dieser Spur im Vergleich zu den anderen Spuren höhere Hintergrundsignal, das eine sichere Beurteilung erschwerte. Das fragliche Signal hat ein geringfügig höheres Molekulargewicht als das der 3'-myc/hATACR/P3x-Transfektante. Mit den anderen mAbs war kein spezifisches Signal bei den primären Zellen beobachtbar (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die initiale Charakterisierung des neu identifizierten 7-Transmembranrezeptors hATACR/XCR1/GPR5 (Heiber et al. 1995), der erst vor wenigen Jahren als ATAC-spezifischer Rezeptor identifiziert wurde (Yoshida et al. 1998). Jeder Chemokinrezeptor scheint neben der wichtigsten, allen Rezeptoren gemeinsamen biologischen Funktion, nämlich der Regulation der Wanderung von Leukozyten, noch eine eigene spezifische Rolle zu spielen, die durch seine Expression durch einen bestimmten Zelltyp und durch die zeitliche und örtliche Spezifität der zugehörigen Ligandenbindung determiniert wird. Durch die Kenntnis der Selektivität, des Expressionsmusters sowie durch die Charakterisierung der Genexpressions-Regulierung des humanen ATAC-Rezeptors/XCR1 könnte somit ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis seiner spezifischen Funktion geleistet werden, sowie auch der biologischen Funktionen des Chemokinliganden, ATAC, über die noch immer nur wenig bekannt ist. Die in einigen Publikationen (Kelner et al. 1994) beschriebene chemotaktische Wirkung von ATAC konnte von Dorner et al. (1997) sowie von anderen (Bleul et al. 1996; Yoshida et al. 1998) nicht bestätigt werden.

Das Expressionsmuster des humanen ATAC-Rezeptors ist bislang noch nicht gut definiert. Northern Blot-Experimente zeigten im humanen System eine hohe Expression in der Plazenta und eine schwächere Expression in der Milz und im Thymus, während in PBMCs nur eine sehr geringe mRNA-Expression nach langer Exposition detektiert werden konnte (Yoshida et al. 1998). Mittels RT-PCR konnte im murinen System eine Expression durch CD8⁺ T-Zellen und NK1.1⁺-Zellen gezeigt werden (was auf eine autokrine Wirkung hinweisen könnte, da diese Zellen auch als die Hauptproduzenten gelten) sowie im Northern Blot eine schwache Expression in Milz und Lunge (keine Expression in der RT-PCR durch CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen oder Makrophagen) (Yoshida et al. 1999).

Dorner et al. (2002) fanden im murinen System mittels RT-PCR eine ATACR-Expression in mit IFN- γ stimulierten BMMs (bone marrow-derived macrophages), nicht jedoch in ruhenden BMMs und auch nicht nach Stimulation mit LPS, Infektion mit Listerien oder Inkubation mit IL-12.

Shan et al (2000) konnten anhand von mRNA-dot blots aus verschiedenen Geweben eine hohe hATACR/XCR1 mRNA-Konzentration in Plazenta, Thymus und Milz nachweisen, während die Expression in Lymphknoten, fetaler Milz und PBMCs nur gering war. Huang et al. (2001) zeigten mittels RT-PCR im murinen System eine hATACR/XCR1 mRNA-Expression in T- und

B-Zellen und in Neutrophilen, während keine Expression in Monozyten und DCs detektiert wurde.

Monoklonale Antikörper (mAbs) haben sich als wichtige Hilfsmittel bei der Charakterisierung verschiedener Chemokinrezeptoren wie beispielsweise CCR5, CXCR3 oder CCR3 erwiesen (Bleul et al. 1997; Wu et al. 1997; Heath et al. 1997; Qin et al. 1998): mAbs sind durch ihre potentielle Einsetzbarkeit in der Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie für bestimmte Fragestellungen wie z.B. der Zelloberflächenexpression und somit für funktionelle Untersuchungen ein entscheidendes Hilfsmittel; daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein hATACR-spezifischer Antikörper etabliert werden, mit dessen Hilfe dann die Charakterisierung des Rezeptors erfolgen sollte.

In einem ersten Schritt wurden zunächst Transfektanten generiert, mit deren Hilfe die Hybridom-Überstände dann im Verlauf auf ihre Spezifität geprüft wurden.

4.1. Generierung und Charakterisierung unterschiedlicher hATAC-Rezeptor-Transfektanten

Es wurden zunächst verschiedene Zelllinien, die den ATAC-Rezeptor überexprimieren, generiert und im weiteren einer eingehenden Analyse ihres Rezeptorexpressionsniveaus mithilfe verschiedener Methoden unterzogen. Auf diese Weise konnten die folgenden unterschiedlichen Transfektanten etabliert werden, die alle den Rezeptor an ihrer Oberfläche überexprimieren: (1) „3'c-myc/hATACR/P3x“ bzw. (2) „5'c-myc/hATACR/P3x“ (entsprechend hATACR/XCR1 in P3x-Zellen mit einem intra- oder einem extrazellulären c-myc-Markerepitop) sowie (3) eine L-Zell-Transfektante („3'c-myc/hATACR/L-Zellen“).

Während der Kultivierung und Expansion der Transfektanten konnten überraschenderweise erhebliche Schwankungen im Expressionsniveau der Transfektanten beobachtet werden, die eine regelmäßige Kontrolle der Rezeptoroberflächenexpression erforderlich machten.

Auch andere Arbeitsgruppen (z.B. Schweickart et al. 2000) berichten von Schwierigkeiten bei der Expression von 7 TM-Rezeptoren in eukaryotischen Zellen, was möglicherweise auf die Größe und komplexe Struktur dieser aus ca. 300-350 Aminosäuren bestehenden Rezeptoren zurückzuführen ist. Außerdem beschrieben sie eine Zunahme der Zelladhäsion und ein Absinken der Wachstumsrate bei GPCR-Transfektanten und berichten, dass einige Chemokinrezeptoren

nicht stabil exprimiert werden können und dass bestimmte funktionelle Antworten verloren gehen, wenn nicht eine wiederholte Selektion erfolgt.

4.2. Etablierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den humanen ATAC-Rezeptor/XCR1

Zur genaueren Charakterisierung des hATAC Rezeptors (XCR1) wurden zunächst monoklonale Antikörper etabliert. Für die Immunisierung der Mäuse wurde ein synthetisches N-terminales Peptid verwendet, das den ersten 31 AS des Rezeptors entsprach, da der N-terminale (extrazelluläre) Bereich des Rezeptors als der Teil des Rezeptors gilt, der die höchste Immunogenität aufweist und darüber hinaus entscheidend für die Determinierung der Liganden-Spezifität verantwortlich ist und an der Bindung des Liganden beteiligt ist (Wu et al. 1996; Premack & Schall 1996; Chuntharapai A. et al. 1997). Die Mehrheit der verfügbaren mAKs gegen Chemokinrezeptoren bindet an Epitope in der aminoterminalen extrazellulären Domäne, darunter die mAKs gegen CXCR1 (Chuntharapai, A. et al. 1994), CXCR2, CCR5 und DARC (Peiper et al. 1997).

Die Spezifität der gewonnenen Hybridom-Überstände wurde durch mehrere unterschiedliche Methoden validiert: in einem ersten Screeningprozess wurde die Fähigkeit der Hybridom-Überstände, das synthetische hATACR-Peptid im ELISA zu erkennen, überprüft. Zweitens wurden die im ELISA positiven Überstände auf der Grundlage ihrer unterschiedlichen Reaktivität mit den transfizierten Zellen einerseits und den nichttransfizierten Mutterzellen andererseits durchflusszytometrisch weiter selektioniert. Hierdurch konnten mehrere Klone gefunden werden, die mit der Screening-Transfektante (3'c-myc/hATACR/P3x) eine gute Reaktivität zeigten (5C5, 6F8, 6D2, 1F1) und die dann (außer 6F8) aufgereinigt wurden. Auffallend war, dass *keiner* der im ELISA positiven Überstände mit den Transfektanten reagierte, die das extrazelluläre c-myc Marker-Epitop (5'c-myc/hATACR/P3x) trugen.

Aufgrund dieser Diskrepanz wurde die Spezifität aller aufgereinigten mAKs zusätzlich mit Hilfe aller verfügbaren Rezeptortransfektanten durchflusszytometrisch und immunhistochemisch untersucht.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie waren jedoch ebenfalls überaus widersprüchlich: Während das *polyklonale* hATACR-spezifische Maus-Antiserum eine spezifische Reaktivität mit

allen Transfektanten zeigte, war keiner der *monoklonalen* Antikörper in der Lage, spezifisch *alle* Transfektanten bei gleichzeitig fehlender Reaktivität mit den Wildtypzellen zu detektieren. Die 5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante mit dem extrazellulären c-myc-Epitop wurde (wie es auch schon mit den Hybridomüberständen der Fall war) von *keinem* der mAKs spezifisch erkannt. Ebenso wurde die hATACR/300-19 Transfektante, die einzige Transfektante, die funktionell mit Calcium-Einstrom getestet war, überraschenderweise von keinem der mAKs erkannt. Der mAk 7G11 zeigte (außer mit den L-Zellen) eine Reaktivität mit allen Transfektanten, jedoch auch gleichermaßen mit allen nichttransfizierten Mutterzelllinien, was dafür spricht, dass dieser Antikörper ein unspezifisches Epitop erkennt, das allen Zelllinien gemeinsam ist.

Die Ursache für diese unterschiedliche Reaktivität der mAKs mit den Transfektanten ist nicht gut verstanden, möglicherweise wird durch das Marker-Epitop die Konformation der komplexen Rezeptorstruktur beeinflusst, so dass das relevante Epitop nicht mehr erkannt werden kann, oder die Bindung des Antikörpers wird sterisch behindert (im Falle der 5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante mit dem extrazellulären c-myc Markerepitop). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Reaktivität der Transfektanten mit den mAKs könnte außerdem sein, dass aufgrund der komplizierten Struktur der 7TMR der Rezeptor in den verschiedenen Transfektanten unterschiedlich gefaltet vorliegt, so dass aufgrund der unterschiedlichen 3D-Struktur nicht alle Epitope des Antigens in den verschiedenen Transfektanten gleichermaßen zugänglich sind für den Antikörper. Auch die Arbeitsgruppe von Mackay machte die Beobachtung, dass mAKs gegen Chemokinrezeptoren unterschiedlich und z.T. paradox mit den verschiedenen Transfektanten reagieren (persönliche Mitteilung).

Warum die Reaktivität der *aufgereinigten* mAKs mit den Transfektanten bei durchflusszytometrischer Untersuchung geringer war im Vergleich zur Reaktivität der Hybridomüberstände vor der Aufreinigung ist unklar. Es ist möglich, dass durch die Aufreinigung der Überstände die antigenerkennende Region chemisch so verändert wird, dass es zu einer partiellen Modifikation des Antikörpers kommt, was einen Verlust an Affinität zur Folge haben kann.

Ebenso bleibt offen, warum von einigen Antikörpern (6F8, 7G11) in der Durchflusszytometrie auch die Wildtypzellen oder andere „fremde“ transfizierte Zelllinien (wie die murine ATAC-Transfektante oder die TRAP-Transfektante) erkannt werden. Eine Rezeptorexpression durch die untransfizierten P3x-Mutterzellen, wie es für einige Chemokinrezeptoren beschrieben ist (z.B.

CCR2, CCR3, CCR5 (Wang et al. 1997) konnte mittels Northern Blot ausgeschlossen werden, so dass es sich möglicherweise um eine Kreuzreaktivität der mAks mit einem irrelevanten Epitop auf den Wildtypzellen handelt.

Durch die immunhistochemischen Analysen von Zytospins der transfizierten Zellen mit den mAks konnte leider keine weitere Klärung erreicht werden. Alle mAks führten zu einer unspezifischen Anfärbung sowohl der Transfektanten als auch der nichttransfizierten Wildtyp-Zellen. Möglicherweise wird das relevante Epitop durch die Fixierungsmethode denaturiert, so dass der Antikörper nicht mehr oder nur noch mit geringer Affinität binden kann oder aber die mAKs sind kreuzreaktiv mit einem abundant exprimierten Epitop, so dass die spezifische Färbung überdeckt wird.

Aus den Zell-Lysaten von Rezeptor-Transfektanten gelang es, mit dem mAk 6F8 (und 7G11) ein Protein zu präzipitieren, das durch SDS-PAGE als 30 bis 35 kDa großes Protein identifiziert werden konnte. Die aus den verschiedenen Transfektanten immunpräzipitierten Proteine unterschieden sich in ihrem Molekulargewicht geringfügig voneinander. Die Größenunterschiede sind unter Umständen auf O-glycosylierte Formen des Rezeptor-Moleküls zurückzuführen, so wie auch für ATAC unterschiedliche posttranslationale Modifikationen bekannt sind (Dorner et al. 1997).

Mit dem Ak 6F8 konnte somit ein Hybridomüberstand etabliert werden, der zuverlässig die Fähigkeit zur Immunpräzipitation des nativen hATACR-Proteins und zur Detektion des denaturierten hATACR-Proteins in *allen* transfizierten Zelllinien besitzt. Dies steht in Diskrepanz zur Durchflusszytometrie-Analyse, bei der *keine* der hATACR-Transfektanten von diesem mAk spezifisch erkannt wurde (s.o.). Allerdings sind in der Immunpräzipitation die Proteine denaturiert, so dass hier im Gegensatz zur Durchflusszytometrie die korrekte Faltung keine Rolle mehr spielt.

Die Ergebnisse zur Charakterisierung der mAks weisen somit deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Untersuchungsmethode auf. Dies mag z.T. daran liegen, dass mAks nicht frei von Kreuzreaktionen sind, so insbesondere die mAk der Klasse IgM (Gosh & Campbell 1986). Eine mögliche Ursache für Kreuzreaktivität ist zunächst die geringe Größe des erfassten Epitopes auf dem Antigen, weshalb es möglich ist, dass derselbe mAk auch ähnliche Sequenzen auf anderen Antigenen erfasst. Darüber hinaus werden mAks oft in viel höheren Konzentrationen verwendet als ein entsprechender Antikörper im Serum, so dass auch

Bindungen schwacher Affinität eingegangen werden. Typischerweise liegen die in der Literatur verwendeten mAk-Konzentrationen für die Anfärbung von Transfektanten bei 10 µg/ml, während in der vorliegenden Arbeit 20-40 µg/ml notwendig waren.

Es ist beschrieben, dass mAks sich physikochemisch vielfältiger verhalten und sehr viel unterschiedlicher als polyklonale Immunsereen reagieren können, da Einzeleigenschaften der Antikörper, die sich in einem Serum nivellieren, hier klar hervortreten. So können gegen dasselbe Epitop gerichtete mAk eine unterschiedliche Affinität besitzen und sich unterschiedlich gut für bestimmte Techniken eignen (Peters & Baumgarten 1990).

4.3. Analyse des Expressionsmusters des hATAC-Rezeptors

Zum Expressionsmuster des humanen ATAC Rezeptors ist bislang nur wenig bekannt. Die vorhandenen Daten zum Expressionsmuster beziehen sich ausschließlich auf die mRNA Ebene. Die Chemokinrezeptorexpression auf der Zelloberfläche ist jedoch sehr stark variabel, d. h. obwohl mRNA in der Zelle gefunden wird, korrespondiert dies noch nicht unbedingt mit funktioneller Rezeptorexpression, sondern korrespondiert in vielen Fällen eher mit einem „internen pool“, so dass hierdurch keine sicheren Erkenntnisse über das Expressionsmuster *in vivo* gewonnen werden können.

Zur Identifikation der hATACR-tragenden Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Techniken angewandt: Durchflusszytometrische Analyse, Immunpräzipitation, Western Blot sowie histologische Anfärbungen mittels APAAP-Methode.

Es ist bekannt, dass die Chemokinrezeptorexpression stark vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig ist. Die Aktivierungsbedingungen, die zu einer Rezeptorexpression führen, sind äußerst komplex und innerhalb der unterschiedlichen Chemokinrezeptoren hochvariabel: Beispielweise führt bei einigen Rezeptoren eine Stimulation durch das T-zellselektive Mitogen PHA und/oder durch IL-2 zu einer *Heraufregulation* der Rezeptorexpression (CCR1, CCR2, CCR5, CCR7, CXCR4 und CXCR3), während bei einigen Rezeptoren (z.B. CCR1, CCR2, CCR5) wiederum durch Stimulation mit PHA alleine eine *Herunterregulation* beobachtet werden kann. Teilweise ist die Expression von der *zusätzlichen* Konditionierung mit IL-2 abhängig oder kann *alleine* durch Stimulation mit IL-2 induziert werden: Loetscher et al. konnten 1996 zeigen, dass die Expression der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR2 auf CD45RO⁺ T-Lymphozyten *kritisch* von der Anwesenheit von IL-2 im Kulturmedium abhängig ist. Durch eine Stimulation mit PHA oder mit anti CD3/anti CD28 konnte hingegen keine CCR1- und CCR2-Induktion erzielt werden,

bzw. wurde (bei gleichzeitiger Stimulation) die IL-2 Wirkung verzögert. Neben der Expression der Rezeptoren CCR1, CCR2 können auch die Rezeptoren CCR5, CCR7, CCR8 und CXCR3 allein durch IL-2 induziert werden, während die Expression von CXCR5 durch IL-2 herunterreguliert wird. Die Stimulation mit IL-2 führt bei CCR7 zunächst zu einer Heraufregulation mit einem Maximum nach 2-3 Tagen und danach zu einem erneuten Absinken auf das Ausgangsniveau innerhalb von 8-10 Tagen (Bleul et al. 1997; Qin et al. 1998; Willmann et al. 1998; Sallusto et al. 1999).

Die Stimulation mit den pharmakologischen Substanzen PMA und Ionomycin, die einen massiven Eingriff in die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade darstellt, führt häufig zu einer Heraufregulation von Chemokinrezeptoren, kann aber auch den gegenteiligen Effekt bewirken (z.B. Herunterregulation von CXCR4 auf Lymphocyten beginnend ca. 30 sec. nach Stimulation mit PMA und Ionomycin [Förster et al. 1998]).

Stimulation mit anti CD3/CD28 kann ebenfalls sowohl zu einer Herauf- als auch zu einer Herunterregulation führen. Anti CD3-Stimulation (unter Anwesenheit von IL-2) führt z.B. bei CCR5 und CXCR3 zunächst zu einer Herunterregulation und erst im weiteren Verlauf nach 5-8 Tagen zu einer Heraufregulation (Qin et al. 1998).

Ebenso kann LPS zu einer Herauf- aber auch Herunterregulation von Chemokinrezeptoren auf Monozyten/Makrophagen führen. Die CCR5-Expression durch Makrophagen wird beispielsweise durch LPS herunterreguliert (Franchin et al. 2000). Auch die Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und (geringer) CCR1 sowie CCR5 auf Monozyten wird durch LPS herunterreguliert (Sica et al. 1997).

Mitunter kann auch durch eine Kokultivierung der Zellen eine Regulation der Rezeptorexpression beobachtet werden. Die CXCR4-Expression ist beispielsweise in reinen Monozytenpopulationen geringer als in Monozyten innerhalb einer gemischten PBMC-Kultur. Die Kokultivierung von Monozyten mit aufgereinigten CD3 pos. T-Zellen führte zu einer verstärkten basalen CXCR4-Expression auf Monozyten, wobei gezeigt werden konnte, dass am ehesten aus den CD3⁺ Zellen stammende lösliche Faktoren die CXCR4-Expression regulieren (Caulfield et al. 2002).

Auch die *Zeitkinetiken* der Rezeptorexpression nach einer Stimulation sind – wie oben bereits angedeutet – sehr variabel. So ist z.B. bei CXCR4 nach Stimulation von humanen T-Zellen mit PHA eine initiale Herunterregulation während der ersten zwei Tage beschrieben, die ab dem vierten Tag von einer starken Induktion der Rezeptorexpression gefolgt wird (Schabath et al. 1999). Von der gleichen Arbeitsgruppe stammt die Beobachtung, dass es auch auf *unstimulierten*

T-Zellen während der ersten 24h der Kultivierung zu einer Zunahme der CXCR4 Expression kommt.

Darüber hinaus können sich die Aktivierungsbedingungen im humanen und murinen System unterscheiden: Die Expression von CXCR4 auf T-Zellen konnte im murinen System durch Stimulation mit PHA heraufreguliert werden, während eine PHA-Stimulation im humanen System den genau gegenteiligen Effekt hatte und zunächst zu einer Herunterregulation führte (Schabath et al. 1999).

In Kenntnis dieser oben beschriebenen äußerst variablen Kinetiken der Expression und der unterschiedlichen Induktionsbedingungen wurden für die ersten durchflusszytometrischen Analysen der primären Zellen mehrere unterschiedliche Aktivierungsbedingungen und eine engmaschige Zeitkinetik gewählt.

Sowohl NTCs als auch PBMCs wurden jeweils mit dem T-zellselektiven Mitogen PHA oder mit den pharmakologischen Substanzen PMA+Ionomycin stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Außerdem wurden unstimulierte und mit LPS aktivierte Monozyten analysiert. Die vorliegenden durchflusszytometrischen Daten weisen auf eine Rezeptor-Expression durch T-Zellen und überraschenderweise auch durch Monozyten hin:

Der mAk 5C5 zeigte konsistent eine Reaktivität mit NTCs und PBMCs, die nach einer Stimulation mit PMA und Ionomycin an Intensität zunahm, jedoch auch schon in ruhenden Zellen nachweisbar war. Eine Stimulation mit PHA und IL-2 bewirkte dagegen keine wesentliche Zunahme der Rezeptorexpression im Vergleich zu den ruhenden Zellen. Möglicherweise war die verwendete IL-2 Konzentration nicht ausreichend, Loetscher et al. verwendeten beispielsweise zur Induktion der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR2 IL-2 in einer Konzentration von 400 U/ml (1996).

Das Ergebnis einer Reaktivität des mAk 5C5 mit NTCs und PBMCs konnte durch die Anfärbung mit dem polyklonalen Maus-Antiserum durchflusszytometrisch bestätigt werden, allerdings mit der Einschränkung, dass unstimulierte PBMCs nicht angefärbt wurden, sondern erst nach Aktivierung mit P+I. Möglicherweise ist die Expression des Rezeptors auf unstimulierten Zellen so niedrig, dass die Sensitivität des polyklonalen Immunsersums nicht ausreichte für eine Detektion. Mit dem polyklonalen Rezeptor-spezifischen Antiserum aus dem Kaninchen konnte wiederum keine spezifische Anfärbung erzielt werden: Die schwache Reaktivität, die mit dem Antiserum und 48 Stunden PMA und Ionomycin stimulierten T-Zellen sichtbar war, entsprach der Färbeintensität des Präimmunsersums. Dies korreliert mit den Durchflusszytometrie-

Ergebnissen der transfizierten Zelllinien, bei denen die Färbeintensität des Kaninchen-Antiserums der des Maus-Antiserums deutlich unterlegen war.

Der hATACR scheint somit bereits von ruhenden T-Zellen exprimiert zu werden und kann durch T-Zell-Aktivierung mit PMA/Ionophor induziert werden. Die Induzierbarkeit durch P+I korreliert mit der Zweisignalabhängigkeit des dazugehörigen Liganden, ATAC. Da T-Zellen auch als eine der Hauptproduzenten von ATAC gelten, weisen die Ergebnisse auf einen möglichen autokrinen/parakrinen Regulationsmechanismus hin (wie z.B. bei Neutrophilen, die sowohl IL-8 Produzenten sind als auch gleichzeitig die beiden Rezeptoren für IL-8, CXCR1 und CXCR2, tragen und somit in der Lage sind, ihre Selbstrekrutierung zu stimulieren).

Dieses Ergebnis einer Rezeptorexpression durch T-Zellen steht in Übereinstimmung mit den Daten von Middel et al. (2001), die mittels RT-PCR eine Rezeptor-Expression auch in ruhenden T-Zellen detektierten, die nach Stimulation mit PMA deutlich heraufreguliert wurde. Allerdings besteht eine Diskrepanz zur Expressionsstärke: Während Middel in ruhenden T-Zellen mittels RT-PCR nur eine schwache Expression detektierte (in Übereinstimmung mit den Daten von Yoshida (1998), die ebenfalls mittels RT-PCR in PBMCs nur ein sehr schwaches Signal detektierten), weisen die vorliegenden durchflusszytometrischen Daten zur Zelloberflächenexpression auf eine auch bereits in unstimulierten T-Zellen deutlich vorhandene Expression. Dennoch scheint auch in unseren Daten die Expression des hATACR/XCR1 wie auch die Expression seines Liganden, ATAC, eng mit der T-Zell-Aktivierung verbunden zu sein. Mittels RT-PCR (durchgeführt von Frau Dr. B. Dorner) konnte ebenfalls eine schwache Expression in ruhenden und in stimulierten T-Zellen sowie in PBMCs gezeigt werden, wobei die Signalstärke – im Unterschied zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie-Analyse – unabhängig von der Aktivierungsdauer immer gleich ausgeprägt war und ruhende Zellen ein gleich starkes Signal wie aktivierte Zellen zeigten. Allerdings ist die Methode der Durchflusszytometrie mit der Möglichkeit der Messung der Zelloberflächenexpression bei dieser Fragestellung als zuverlässiger einzuschätzen als eine RT-PCR Analyse, der mögliche posttranskriptionale Mechanismen in der Regulation des hATACR/XCR1 Proteins nicht zugänglich sind.

Überraschenderweise waren einige der Antikörper auch mit ruhenden und aktivierten Monozyten reaktiv, wobei kein Unterschied zwischen ruhenden und mit LPS-stimulierten Monozyten bestand. Dieses Ergebnis konnte durch unsere RT-PCR-Daten bestätigt werden, die eine Rezeptor-Expression in ruhenden Monozyten zeigte. Hierbei ist zu beachten, dass Monozyten

auch ohne den Zusatz von aktivierenden Agenzien durch die Plastikadhärenz stimuliert werden können. So kann beispielsweise die Sekretion von IL-8 in Monozytenkulturen durch die Adhärenz an Plastik induziert werden (neben einer Vielzahl anderer Stimuli wie z.B. LPS, PHA, IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-7, GM-CSF, IL-3, Concanavalin A, Zymosan, Immunkomplex und Bakterien).

In den bislang publizierten Daten zur Rezeptorexpression wird eine Expression durch Monozyten nicht beschrieben. Allerdings existieren bisher auch noch keine Untersuchungen zur Expression im nativen Proteinkontext.

Da neuere Daten jedoch im murinen System eine ATACR-Expression durch Makrophagen, d.h. gewebeständige Monozyten zeigen, ist eine Expression auch durch im Blut zirkulierende Monozyten gut vorstellbar (Dorner et. al. 2002).

Bei den Monozytenanalysen ist allerdings zu bedenken, dass eine unspezifische Anfärbung durch Bindung des Antikörpers an die Fc-Rezeptoren möglich ist, zumal die erforderliche mAk-Konzentration verhältnismäßig hoch waren im Vergleich zu anderen bekannten, in der Durchflusszytometrie eingesetzten Antikörpern, so dass Kreuzreaktionen oder unspezifische Bindungen erleichtert werden.

Für die Spezifität der Durchflusszytometrie-Analyse spricht jedoch die Reaktivität des hATACR-spezifischen Maus-Antiserums mit den Monozyten (bei fehlender Reaktivität des Präimmunserums). Andererseits kam es durch das Kaninchen-Antiserum zu keiner spezifischen Anfärbung der Monozyten, da die Monozyten sowohl mit dem Kaninchen-Antiserum als auch mit dem als Negativkontrolle verwendeten Präimmunserum in gleicher Weise reagierten.

Hier besteht sicherlich weiterer Klärungsbedarf, beispielsweise sollten die mAks auf anderen Chemokin-Rezeptor-Transfektanten durchflusszytometrisch getestet werden, um auszuschließen, dass die mAks ein mehreren Chemokinrezeptoren gemeinsames Epitop erkennen.

Der Hybridomüberstand 6F8 sowie der mAk 7G11, die beide in der Lage sind, das hATACR-Protein zu immunpräzipitieren und somit sicher den Rezeptor im Protein-Kontext (in denaturierter Form) erkennen, erwiesen sich leider als nicht geeignet für die Durchflusszytometrie: Die Detektion des im nativen Kontext gefalteten Rezeptors mit Hilfe dieser mAks gelang somit nicht. Während der mAk 7G11 keine der verschiedenen untersuchten Zellpopulationen erkannte, lieferte der (IgM) 6F8 Überstand (im Gegensatz zum mAk 5C5) keine kohärenten Ergebnisse.

Durch die Analyse verschiedener Zellpopulationen mittels Immunpräzipitation konnte keine weitere Bestätigung der durchflusszytometrischen Ergebnisse erzielt werden: der Versuch, den Rezeptor aus primären Zellen zu präzipitieren, ist nicht sicher gelungen. Als Ursache kommt beispielsweise eine zu geringe Sensitivität der mAKs bei vermutlich geringer Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche in Frage. Bei zukünftigen Experimenten könnte die Sensitivität durch Oberflächenjodierung und anschließende Immunpräzipitation erhöht werden.

Weiterhin wurde versucht, mit Hilfe der mAKs die ATAC-Rezeptorexpression immunhistochemisch zu definieren: Hierzu wurden mittels APAAP-Technik verschiedene Gewebe (Placenta, Tonsille, Milz) analysiert, in denen sich jedoch keine spezifische Anfärbung zeigte. Somit ist leider keiner der mAKs für histologische Untersuchungen geeignet. Mögliche Ursache ist die Sensitivität des relevanten Epitops gegenüber Fixierungsreagenzien oder eine Kreuzreaktivität. Vorstellbar wäre außerdem, dass der Rezeptor in Tonsille und Milz nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert wird. Von Yoshida et al. (1998) wird die höchste Expression des Rezeptor in der Placenta gesehen, was in unseren Northern Blot und RT-PCR-Daten (durchgeführt von Frau Dr. Dorner) nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise sind diese Diskrepanzen auf Analysen aus Gewebeproben aus unterschiedlichen Placentateilen zurückzuführen, so dass auch histologisch kein Nachweis gelingen konnte, da möglicherweise ein Teil der Placenta mit einer nur geringen oder fehlenden Expression analysiert wurde.

Die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse in Abhängigkeit der verwendeten Untersuchungsmethode spricht dafür, dass die Bindung eines mAKs an sein Antigen sehr stark davon abhängig ist, wie das Antigen den mAKs präsentiert wird. So gibt es beispielsweise mAKs, die mit dem Antigen im ELISA gut reagibel sind, während sie für den Immunoblot nicht geeignet sind. Solche mAKs sind gegen Epitope gerichtet, die bei Veränderungen des Milieus, in dem sich das Antigen befindet, ebenfalls starke Veränderungen zeigen (Peters & Baumgarten 1990)

Ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen stellt die Analyse der Rezeptor-Expression unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion oder eines Tumormodells dar.

Die Expression von ATAC/Ltn an Orten einer inflammatorischen Reaktion ist bislang noch nicht gut untersucht, wohingegen sich mehrere Untersuchungen mit der Rolle von ATAC bei der Tumorabwehr beschäftigen. Inzwischen deuten mehrere Publikationen darauf hin, dass ATAC

und sein Rezeptor eine Rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie bei der Tumorbekämpfung spielen:

Die Daten von Middel et al. (2001) weisen beispielsweise darauf hin, dass ATAC und sein Rezeptor eine Rolle in der Pathogenese des M. Crohn spielen – möglicherweise über eine Rekrutierung von peripheren, den ATAC-Rezeptor tragenden T-Zellen aus der Blutbahn an den Inflammationsort. Mittels quantitativer RT-PCR und in-situ-Hybridisierung konnte eine signifikant höhere hATAC mRNA Expression in vom M. Crohn befallenen Gewebeproben (ca. 8fach) als im gesunden Kontrollgewebe gezeigt werden. Ein ähnliches Verteilungsmuster konnte auch für den hATAC-Rezeptor beobachtet werden.

Als ATAC exprimierende Zellen konnten vorwiegend CD3⁺ T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) identifiziert werden, aber auch Mastzellen und unerwarteterweise auch reife dendritische Zellen. Durch Stimulation mit PMA und ConA kam es zu einer Heraufregulation von ATAC/Ltn und seinem Rezeptor, während die mRNA Expression in unstimulierten T-Zellen sehr gering war. Somit bestätigt sich, dass die Expression von ATAC aber auch von seinem Rezeptor eng mit der T-Zell-Aktivierung assoziiert ist.

Blaschke et al. (2003) konnten zeigen, dass ATAC und sein Rezeptor auch bei der Rheumatoiden Arthritis eine Rolle spielen. ATAC und sein Rezeptor konnten im Synovia Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis signifikant häufiger als bei den Kontrollpatienten mit Osteoarthritis nachgewiesen werden. Dieser Unterschied bezog sich jedoch nur auf das Synovialgewebe und nicht auf die Synovia-Flüssigkeit oder das periphere Blut, was dafür spricht, dass die Expression von ATAC und seinem Rezeptor sehr lokalisiert ist. Als ATAC produzierende Zellen konnten Lymphozyten (CD8⁺ T-Zellen, in deutlich geringerem Ausmaß auch CD4⁺ T-Zellen) identifiziert werden.

Für eine weitergehende Analyse der ATACR-Expression und zur Aufklärung der biologischen Funktion von ATAC erscheint somit eine Fokussierung auf Inflammations- und Tumormodelle äußerst erfolgversprechend. Möglicherweise sind die widersprüchlichen Ergebnisse bei der Analyse der hATACR-spezifischen mAbs darauf zurückzuführen, dass unter Umständen die Expression des Rezeptors im gesunden Gewebe zu gering ist (oder der Rezeptor wird nur von einer ganz bestimmten, anzahlmäßig geringen Zellpopulation exprimiert), so dass der Nachweis schwierig ist und erst nach einer Heraufregulation des Rezeptors im Rahmen von Krankheitsbedingungen bzw. durch fokussierte Untersuchung bestimmter Zellpopulationen gelingt.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten *in vitro* eine Assoziation von ATAC/Ltn mit einer Th1-T-Zell-Differenzierung zeigen (Bradley et al. 1999; Rogge et al. 2000; Nagai et al. 2001). Dorner und Kollegen (Dorner et al. 2002) gelang es *in vitro* und auch *in vivo* in einem murinen Listeriose Modell (einem klassischen Th1-Modell) eine weitere biologische Funktion von ATAC charakterisieren: Es konnte gezeigt werden, dass MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und ATAC auf Einzelzellebene *in vitro* und *in vivo* in einem hohen Ausmaß mit IFN- γ (dem prototypischen Th1 Zytokin) durch aktivierte NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen (Th1-Zellen) kosezerniert werden, sowie darüberhinaus eine synergistische Wirkung auf Makrophagen als die gemeinsame Zielzelle ausüben. ATAC, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES wirken somit als Koaktivatoren von Makrophagen und konstituieren zusammen mit IFN- γ die Gruppe der Typ1-Zytokine, die *in vitro* nur in Th1-Zellen und nicht in Th2-Zellen nachgewiesen werden können. Mehrere andere Untersuchungen im Rahmen von klinischen und experimentellen Inflammationsmodellen (z.B. Diabetes, Encephalomyelitis, Glomerulonephritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, akute Allograft-Transplantatabstoßungsreaktion) unterstützen die Hypothese, dass ATAC eine Rolle bei Th1-Inflammationsreaktionen spielt (Wang et al. 1998; Natori et al. 1998; Bradley et al. 1999; Tran et al. 2000; Middel et al. 2001).

Die oben genannten Untersuchungen lieferten einige überraschende Daten zum Expressionsspektrum des Rezeptors (Expression des ATAC-Rezeptors durch Synovia-Makrophagen, FLS [fibroblast-like synoviocytes], sowie durch BMMs [bone marrow derived macrophages]) neben der bereits bekannten Expression durch Lymphozyten. Dies spricht dafür, dass bei der Analyse des Rezeptorexpressionsspektrums auch „untypische“ Zellpopulationen und Zellen außerhalb des Immunsystems mit einbezogen werden müssen.

Die bislang publizierten Untersuchungen zur ATACR-Expression sind auf mRNA-Ebene oder mittels ELISA durchgeführt worden. Zum vollständigen Verständnis der biologischen Funktion ist jedoch eine Analyse der Rezeptorexpression auf Einzelzellebene unabdingbar.

Dorner et al. (2003) konnten beispielsweise durch Einzelzellanalyse mittels Durchflusszytometrie nachweisen, dass die kleine Zellpopulation der CD4⁺ ATAC sezernierenden Zellen dem Gedächtnis-Phänotyp angehört.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit mit 6F8 ein Hybridom-Überstand etabliert werden, der äußerst zuverlässig den humanen ATAC-Rezeptor immunpräzipitiert und der für weiterführende Untersuchungen eingesetzt werden kann.

Die Einsatzfähigkeit der monoklonalen Antikörper für die Durchflusszytometrie-Analyse hingegen kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Weitere Analysen sind erforderlich, um die Spezifität der Monozyten-, PBMC- und NTC-Reaktivität zu verifizieren.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die initiale Charakterisierung des humanen ATAC-Rezeptors (hATACR), eines Sieben-Transmembran-Rezeptors. Zur Analyse des Expressionsspektrums des Rezeptors sollte ein monoklonaler Antikörper (mAk) hergestellt werden.

Zunächst wurden zum Screening der Hybridomüberstände verschiedene Transfektanten generiert, die den hATACR an ihrer Oberfläche exprimierten: In der murinen Myelomzelllinie P3x63Ag8.653 die beiden Transfektanten „3'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante“ (mit einem intrazellulären Markerepitop) und „5'c-myc/hATACR/P3x-Transfektante“ (mit einem extrazellulären Markerepitop), in einer L-Zelllinie die Transfektante „3'c-myc/hATACR/L-Zellen“ (mit einem intrazellulären Markerepitop).

Für die Herstellung der Antikörper wurden mehrere Mäuse mit einem Peptid immunisiert, das die 31 N-terminalen Aminosäuren des hATACR enthielt. Nach erfolgter Fusion der Milzzellen der immunisierten Mäuse mit dem Myelom P3x63Ag8.653 wurden 588 Hybridome etabliert. Diese wurden in einem mehrstufigen Verfahren auf ihre Spezifität durchmustert. Zunächst wurden im ELISA alle Hybridom-Überstände auf die Bindung des synthetischen hATACR-Peptids untersucht, hierbei waren 54 Hybridome positiv. In einem zweiten Schritt wurden diese Überstände auf ihre Fähigkeit getestet, die generierten hATACR-Transfektanten in der Durchflusszytometrie anzufärben. Hybridome, deren Überstände sowohl im ELISA als auch in der Durchflusszytometrie positive Ergebnisse ergaben, wurden subkloniert und (mit Ausnahme des Klonen 6F8) aufgereinigt. Auf diese Weise konnten vier mAKs (5C5, 1F1, 6D2, 6F8) etabliert werden, die für weitere Tests herangezogen wurden.

Es wurden Immunpräzipitationsexperimente mit den hATACR-Transfektanten durchgeführt, diese wurden auch für Western Blots eingesetzt. Darüber hinaus wurden die mAKs in der Immunhistologie getestet. Diese Untersuchungen ergaben, dass der mAk 6F8 zuverlässig den hATACR aus allen Transfektanten immunpräzipitieren konnte. Während der spezifische Nachweis des ATACR-Peptids im ELISA durch die mAKs reproduzierbar gelang, war die Anfärbung der ATACR Transfektanten in der Durchflusszytometrie inkonsistent. Der Grund hierfür mag in der Unfähigkeit der mAKs liegen, den nativen Rezeptor zu erkennen. Andererseits könnte es möglich sein, dass der transfizierte Rezeptor in einzelnen Transfektanten nicht in seiner physiologischen Konformation vorlag, was bereits von anderen Untersuchern beobachtet worden ist. Mit dem mAk 6F8 konnte jedoch ein Reagenz hergestellt werden, das für die weitere biochemische Charakterisierung des hATACR von erheblichem Nutzen sein wird.

6. Literaturverzeichnis

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C. et al. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.

Bacon, K.B., Schall, T.J. (1996). Chemokines as mediators of allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **109**, 97-109.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC Chemokines. *Adv. Immunol.* **55**, 97-179.

Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568.

Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J. Int. Med.* **250**, 91-104.

Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G. et al. (1997). A new class of membrane bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**, 640-644.

Ben-Baruch, A., Michiel, D.F. & Oppenheim, J.J. (1995). Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 11703-11706.

Berger, E.A., Murphy, P.M., Faber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 657-700.

Bianchi, G., Sozzani S., Zlotnik, A., Mantovani, A., Allavena, P. (1996). Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. *Eur. J. Immunol.* **26**, 3238-3241.

Blaschke, S., Middel, P., Dorner, B.G. et al. (2003). Expression of activation-induced, T cell derived, and chemokine related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. *Arthritis&Rheum.*, **48** (7), 1858-1872.

Bleul C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., Springer, T.A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* **184**, 1101-1109.

Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer T.A., Mackay, C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1925-1939.

Boismenu, R, Feng, L., Xia, Y., Chang, J., Havran, W. (1996). Chemokine expression by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J. Immunol.* **157**, 985-992.

Bonecchi, R., G., Bianchi, P.P., Bordignon, D. et al. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* **187**, 129-134

Boyum, A. (1964). Separation of white blood cells. *Nature* **204**, 793-794.

Bradley, L.M., Asensio, V.C., Schioetz, L.K. et al. (1999). Islet-specific Th1, but not Th2 cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *Immunol.* **162**, 2511-2520.

Burnette, W.N. (1981). „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochem.* **112**, 195-203.

Butcher, E.C., Picker, L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-66.

Cairns C.M., Gordon J.R., Li F., Baca-Estrada M.E., Moyana T., Xiang J. (2001). Lymphotactin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. *J. Immun.* **167**, 57-65.

Cao, X., Zhang, W., He, L. et al. (1998). Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvans for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J. Immunol.* **161**, 6238-6244.

Caulfield, J., Fernandez, M., Snetkov, V., Lee, T., Hawrylowicz, C. (2002). CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3⁺ T cells. *Immunol.* **105**, 155-162

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y. et al. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.

Chuntharapai, A., Lee, J., Burnier, J., Wood, W.I., Hebert, C., Kim, K.J. (1994). Neutralizing monoclonal antibodies to human IL-8 receptor A map to the NH₂ terminal region of the receptor. *J. Immunol.* **152**, 1783-1789

Chuntharapai, A., Kim, K.J. (1997). Generation of monoclonal antibodies to chemokine receptors, *Methods Enzymol.* **288**, 15-27.

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cell. *Science* **270**, 1811-1815.

Colbère-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. & Garapin, A.C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* **150**, 1-14.

Coller, H.A., Coller, B.S. (1983). Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. In: Langone, J.J., Van Vunakis, H. (eds) *Meth. Enzymol.* **121**, 412-417. Academic Press. New York.

Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N. et al. (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-complexes). *J. Histochem. Cytochem.* **32**, 219-229.

Cyster, J.G. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*, **286**, 2098-2102.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W. et al. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.

- Dilloo, D., Bacon, K., Holden, W. et al. (1996). Combined chemokine and cytokine gene transfer enhances antitumor immunity. *Nature Med.* **2**, 1090-1095.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y. et al. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158.
- Dorner, B., Müller, S., Entschladen, F. et al. (1997). Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8⁺ T cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 8817-8823.
- Dorner, B., Scheffold, A., Rolph, M.S. et al. (2002). MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6181-6186.
- Dorner, B., Steinbach, S., Hüser, M.B., Kroczeck, R.A., Scheffold, A. (2003). Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* **274**, 83-91.
- Eisen, S.A., Wedner, H.J., Parker, C.W. (1972). Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol. Commun.* **1**, 571-577.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of seven transmembrane G protein coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.
- Fernandez, E.J. & Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 469-99.
- Förster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* **87**, 1037-1047.

Förster, R., Kremmer, E. et al. (1998). Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J. Immunol.* **160**, 1522-1531.

Franchin, G., Zybarth, G., Dai, W.W. et al. (2000). Lipopolysaccharide inhibits HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages through direct and sustained down-regulation of CC chemokine receptor 5. *J. Immunol.* **164**, 2592-601.

Freshney, R.I. (1987). Culture of animal cells: A manual of basic technique. Alan R. Liss Inc., New York.

Gerard, C., Rollins, B.J. (2001). Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* **2**, 108-115.

Giancarlo, B., Silvano, S., Albert, Z., Mantovani, A. & Allavena, P. (1996). Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. *Eur. J. Immunol.* **26**, 3238-3241.

Gosh, S., Campbell, A.M. (1986). Multispecific monoclonal antibodies. *Immunol. Today* **7**, 217-222.

Gudermann, T., Nürnberg, B., Schultz, G. (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J. Mol. Med.* **73**, 51-63.

Harlow, E. & Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York.

Heath, H., Qin, S., Rao, P. et al. (1997). Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.* **99**: 178-84

Hedrick, J.A., Saylor, V., Figueroa, D. et al. (1997). Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J. Immunol.* **158**, 1533-1540.

Hedrick, J.A., Zlotnik, A.: Molecule of the month: Lymphotactin. 1998. *Clin. Immunol. Immunopath.* **87**, 218-222.

- Heiber, M., Docherty, J.M., Shah, G. (1995). Isolation of three novel human genes encoding G protein-coupled receptors. *DNA Cell Biol.* **14**, 25-35.
- Homey, B., Zlotnik, A. (1999). Chemokines in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 626-634.
- Horuk, R. (editor) (1997). Chemokine receptors. *Meth. Enzym.* **288**, Academic press, New York.
- Horuk, R. (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 313-335.
- Huang, H., Li F., Cairns, C.M., Gordon, J.R., Xiang, J. (2001). Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **281**, 378-382.
- Huang, H., Li, F., Gordon, J.R., Xiang, J. (2002). Synergistic enhancement of antitumor immunity with adoptively transferred tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells and intratumoral lymphotactin transgene expression. *Cancer research* **62**, 2043-2051.
- Karasuyama, H., Tohyama, N. & Tada, T. (1989). Autocrine growth and tumorigenicity of interleukin 2- dependent helper T cells transfected with IL-2 gene. *J. Exp. Med.* **169**, 13-25.
- Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B. et al. (1994). Lymphotactin: A cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**, 1395-1399.
- Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S. et al. (1995). Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* **155**, 203-209.
- Kim, C.H., Broxmeyer, H.E. (1999). Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 6-15.
- Kunkel, E.J. & Butcher, E.C. (2002). Chemokines and the tissue-specific migration of leukocytes. *Immunity* **16**, 1-4.

- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem Biophys. Meth.* **10**, 203-209
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M., Moser, B. (1996). Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **184**, 569-577.
- Luster, A.D. (1998). Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* **338**, 436-445.
- Mackay, C.R. (1996). Chemokine receptors and T cell chemotaxis. *J. Exp. Med.* **184**, 799-802.
- Maghazachi, A., Al-Aoukaty, A. & Schall, T.J. (1996). CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56⁺ cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 315-319.
- Mason, D.Y. (1985). Immunocytochemical labeling of monoclonal antibodies by the APAAP immunoalkaline phosphatase technique. In: Bullock G. R., Petrusz, P. (eds), *Techniques in Immunocytochemistry Vol.3*, Academic Press, London, pp 25-42.
- McFadden, G. & Kelvin, D. (1997). New strategies for chemokine inhibition and modulation: you take the high road and I'll take the low road. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1271-1280.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Manes, S., Martinez-A., C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 397-421.
- Middel, P., Thelen, P., Blaschke, S. et al. (2001). Expression of the T cell chemoattractant chemokine lymphotactin in Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* **159**, 1751-1761.

- Moser, B. & Loetscher, P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* **2**, 123-128.
- Müller, S., Dorner, B., Korthäuer, U. et al. (1995). Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8⁺ T-lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1744-1748.
- Müller, S. (1998). Charakterisierung des neuen Cytokins ATAC auf cDNA- und Protein-Ebene. Dissertation zur Vorlage an der Freien Universität Berlin.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F. et al. (2000). International Union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharm. Rev.* **52**, 145-176.
- Nagai, S., Hashimoto, S., Yamashita, T. et al. (2001). Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2- polarized cells. *Int. Immunol.* **13**, 367-376.
- Natori, Y., Ou, Z., Yamamoto-Shuda, Y., Natori, Y. (1998). Expression of lymphotactin mRNA in experimental crescentic glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 265-268.
- Newton, R.C. & Vaddi, K. (1997). Biological responses to CC chemokines. *Meth. Enzymol.* **287**, 174-186.
- Olson, T.S. & Ley, K. (2002). Chemokines and chemokine receptor in leukocyte trafficking. *Am J Physiol. Regulatory Comp Physiol.* **283**, 7-28.
- Otten, G., Yokoyama, W.M. (1992). Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan. In: Current Protocols in immunology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ou, Z.L., Hotta, O., Natori, Y., Sugai, H., Taguma, Y., Natori, Y. (2002). Enhanced expression of C chemokine lymphotactin in IgA nephropathy. *Nephron* **91**, 262-269.
- Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H. et al. (1997). Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* **387**, 6111-617.

Peiper, S. C., Lu, Z.-H., Zhang, T.-Y., Wang, Z.-W. (1997). Chimeric chemokine receptors for analysis of structure-function relationships. in: Horuk, Methods in Enzym.

Peters, J.H. & Baumgarten, H. (Hrsg.) (1990). Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlag, 2. Auflage

Premack, B.A. & Schall, T. J. (1996). Chemokine receptors: gateway to inflammation and infection. *Nat. Med.* **2**, 1174-1178.

Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P. et al. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associates with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* **101**, 746-754.

Rogge, L., Bianchi, E., Biffi, M. et al. (2000). Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* **25**, 96-101.

Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* **90**, 909-928.

Rossi, D., L., Hardiman, G, Copeland, N.G. et al. (1998). Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine. *Genomics* **47**, 163-170.

Rousseau, R.F., Haight, A.E., Hirschmann-Jax, C. et al. (2003). Local and systemic effects of an allogeneic tumor cell vaccine combining transgenic human lymphotactin with interleukin-2 in patientes with advanced or refractory neuroblastoma. *Blood* **101**, 1718-1726.

Rumsaeng, V., Vliagoftis, H., Oh, C., Metcalfe, D. (1997). Lymphotactin gene expression in mast cells following Fc (ϵ) receptor I aggregation: modulation by TGF-b, IL-4, dexamethasone, and cyclosporine A. *J. Immunol.* **158**, 1353-1360.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Mackay, C.M. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* **19**, 568-574.

Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B. et al. (1999). Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2037-45.

Sallusto, F., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 593-620.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1998). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schabath, R., Müller, G., Schubel, A., Kremmer, E., Lipp, M., Förster, R. (1999). The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 996-1004.

Schweickart, V.L., Epp, A., Raport, C.J., Gray, P.W. (2000). CCR11 is a functional receptor for the monocyte chemoattractant protein family of chemokines. *J. Biol. Chem.* **275**, 9550-9556.

Shan, L., Qiao, X., Oldham, E. et al. (2000). Identification of viral macrophage inflammatory protein (vMIP)-II as a ligand for GPR5/XCR1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **268**, 938-941.

Sica, A., Saccani, A., Borsatti, A. et al. (1997). Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C Chemokine receptors in human monocytes. *J. Exp. Med.* **185**, 969-974

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

Taub, D.D., Sayers, T.J., Carter, C.R.D. & Ortaldo, J.R. (1995). Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **155**, 3877-3888.

Taub, D.D., Turcovski-Coorales, S.M., Key, M.L., Longo, D.L. & Murphy, W.J. (1996). Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J. Immunol.* **156**, 1095-2103.

Ting, A. & Morris, P.J. (1971). A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. *Vox sanguinis* **20**, 561-563.

Tran, E.H., Kuziel, W.A., Owens, T. (2000). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient in either the chemokine macrophage inflammatory protein- 1alpha or its CCR5 receptor . *Eur. J. Immunol.* **30**, 1410-1415.

Wang, J.-D., Nonomura, N., Takahara, S. et al. (1998). Lymphotactin: a key regulator of lymphocyte trafficking during acute graft rejection. *Immunol.* **95**, 56-61.

Wang,Q., Yu, H., Zhang, L. et al. (2002). Adenovirus-mediated intratumoral lymphotactin gene transfer potentiates the antibody-targeted superantigen therapy of cancer. *J. Mol. Med.* **80**, 585-594.

Wang, Z.X. et al. (1997) aus: Horuk, R. (editor) (1997). Chemokine receptors. *Meth. Enzym.* **288**, Academic press, New York. Chemokine receptors.

Ward, S.G., Bacon, K., Westwick, J. (1998). Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* **9**, 1-11.

Willmann, K., Legler, D.F., Loetscher et al. (1998). The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2025-2034.

Wu, L., LaRosa, G., Kassam, N. et al. (1997). Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp 120 binding and a single domain for chemokine binding. *J. Exp. Med.* **186**, 1373-81

Xia, D.J., Zhang, W.P., Zheng, S. et al. (2002). Lymphotactin cotransfection enhances the therapeutic efficacy of dendritic cells genetically modified with melanoma antigen gp100. *Gene Ther.* **9**, 592-601.

Yoshida, T., Imai, T, Kakizaki, M., Nishimura, M., Yoshie, O. (1995). Molecular cloning of a novel C or γ type chemokine, SCM-1. *FEBS Lett.* **360**, 155-159.

Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., Yoshie, O. (1998). Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J. Biol. Chem.* **273**, 16551-16554.

Yoshida, T., Izawa, D., Nakayama, T. et al. (1999). Molecular cloning of mXCR1, the murine SCM-1/lymphotactin receptor. *FEBS Lett.* **458**, 37-40.

Zhang, W., He, L., Yuan, Z. et al. (1999). Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1151-1161.

Zlotnik, A. & Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127.

Danksagung

Von Herzen bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Richard A. KroczeK und Frau Dr. Brigitte Dorner, die mich in das Thema eingewiesen und die mich während der gesamten Zeit im Labor und während des Schreibens hervorragend betreut haben. Das Gelingen der Arbeit wäre ohne ihre Anleitung, ihre hilfreiche Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen nicht möglich gewesen.

Herr Dr. Andreas Hutloff stand mir immer mit großer Geduld bei jeglichen Fragen zur Seite – ihm sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für das hervorragende Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft herzlich danken.

Außerdem danke ich Frau Petra Jahn und Frau Katja Ranke für ihre Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente ganz herzlich.

Für alles danke ich: Georg Toepfer

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Anne Becher, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Initiale Charakterisierung des humanen ATAC-Rezeptors, eines neuen Sieben-Transmembran-Rezeptors“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

29.05.2007

Anne Becher