

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
(Leiter: Prof. em. Dr. med. Hans-Dieter Flad,
Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus)

Einfluß thrombozytärer CXC-Chemokine auf die Interaktion von Neutrophilen mit Endothelzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck
-Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät-

vorgelegt von
Birgit Schenk
Lübeck 2001

Vorsitzender..... Prof. Dr. G. Schäfer
1. Berichterstattender..... Prof. Dr. E. T. Rietschel
2. Berichterstattender..... Prof. Dr. W. Jelkmann
Tag der mündlichen Prüfung:..... 20. März 2001

Berichte aus der Biologie

Birgit Schenk

**Einfluß thrombozytärer CXC-Chemokine auf
die Interaktion von Neutrophilen mit Endothelzellen**

Shaker Verlag
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Schenk, Birgit:

Einfluß thrombozytärer CXC-Chemokine auf die Interaktion
von Neutrophilen mit Endothelzellen / Birgit Schenk.

Aachen : Shaker, 2001

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Lübeck, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-8792-8

Copyright Shaker Verlag 2001

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-8792-8

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1. Chemokine.....	14
2.2. Antikörper und Antisera.....	14
2.3. Isolierung und Kultivierung humaner Zellen.....	16
2.3.1. Neutrophile Granulozyten (Neutrophile).....	16
2.3.1.1. Isolierung.....	16
2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität.....	16
2.3.2. Endothelzellen.....	17
2.3.2.1. Präparation aus Nabelschnüren.....	17
2.3.2.2. Kultivierung von humanen Endothelzellen.....	18
2.3.2.3. Bestimmung der Reinheit von Endothelzellen.....	19
2.3.3. Humane Thrombozyten.....	20
2.3.3.1. Präparation.....	20
2.4. Biologische Testverfahren.....	20
2.4.1. Bestimmung der Adhärenz von Neutrophilen an Endothelzellen.....	20
2.4.1.1. Adhärenzassay.....	21
2.4.1.2. Blockierung der Adhärenz.....	22
2.4.2. Transendotheliale Migration von Neutrophilen.....	23
2.4.2.1. Kultivierung von Endothelzellen auf Transwell-Einsätzen.....	23
2.4.2.2. Kontrolle der Ausbildung eines festen Endothelzellmonolayers auf Transwell-Einsätzen.....	24
2.4.2.3. Transmigrationsassay.....	24
2.4.3. Proteolytische Prozessierung von NAP-2 Vorläufermolekülen.....	25
2.4.3.1. Prozessierung von CTAP-III in Gegenwart von Endothelzellen.....	25
2.4.3.2. Prozessierung von NAP-2-Vorläufermolekülen in Kokulturen von Thrombozyten und Neutrophilen.....	26
2.4.4. Degranulations-Test zum Nachweis von NAP-2 (Elastase-Freisetzung).....	27
2.4.5. Durchflußzytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen.....	28
2.4.5.1. Stimulation und Markierung von Neutrophilen.....	29
2.4.5.2. Stimulation und Markierung von Endothelzellen.....	29

2.4.5.3.	Analyse im Durchflußzytometer.....	31
2.5.	Biochemische Testverfahren.....	31
2.5.1.	Proteinbestimmung.....	31
2.5.2.	Jodierung von CTAP-III.....	32
2.5.3.	Kopplung von FITC an BSA.....	32
2.5.4.	Reduzierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.5.5.	Western Blot.....	34
2.5.6.	Sandwich-ELISA.....	34
2.5.6.1.	Quantitative Bestimmung von β -TG Antigen.....	35
2.5.6.2.	Quantitative Bestimmung von Lactoferrin.....	35
2.5.7.	Immunaффinitätschromatographie.....	36
2.5.7.1.	Vorbereitung der Proben für die Immunaффinitätschromatographie.....	36
2.5.7.2.	Immunaффinitätschromatographie von β -TG Ag.....	37
3.	ERGEBNISSE.....	38
3.1.	Einfluß thrombozytärer Chemokine auf die Adhärenz von Neutrophilen an Endothelzellen.....	38
3.1.1.	Induktion der Zelladhärenz durch CTAP-III und NAP-2: Vergleich der Dosis-Wirkungsprofile mit denjenigen von IL-8 und PF-4.....	38
3.1.2.	Freisetzung von Granulainhalten durch Neutrophile während der Chemokin- induzierten Adhärenz.....	41
3.1.3.	Modulation der Zelloberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen und Endothelzellen durch CTAP-III und NAP-2.....	42
3.1.4.	An der spezifischen Adhärenz beteiligte Adhäsionsmoleküle Neutrophiler nach Stimulation mit CTAP-III und NAP-2.....	46
3.1.5.	Mechanismus der durch CTAP-III induzierten Adhärenz.....	47
3.1.5.1.	Entstehung von NAP-2 während der CTAP-III-induzierten Adhärenz.....	48
3.1.5.2.	Prozessierung von CTAP-III durch Endothelzellen.....	50
3.1.5.3.	Einfluß von Aprotinin auf die CTAP-III-induzierte Adhärenz.....	53
3.1.5.4.	Einfluß einer Jodierung von CTAP-III auf die Fähigkeit des Chemokins zur Adhärenzinduktion.....	55
3.1.5.5.	Einfluß blockierender mAk gegen CXCR-1 und CXCR-2 auf die CTAP-III-induzierte Adhärenz.....	57
3.1.5.6.	Einfluß einer Kombination von Aprotinin und mAk α -CXCR-2 auf die durch CTAP-III induzierte Zelladhärenz.....	59
3.1.6.	Modulation der CTAP-III- und NAP-2-induzierten Zelladhärenz durch PF-4.....	60

3.2. Einfluß der thrombozytären Chemokine auf die transendotheliale Migration von Neutrophilen	63
3.2.1. Induktion der transendothelialen Migration durch NAP-2, CTAP-III, PF-4 und IL-8	63
3.2.2. Modulation der transendothelialen Migration von Neutrophilen durch CTAP-III und NAP-2	65
3.2.3. Einfluß von CTAP-III und NAP-2 auf die Zelloberflächen-Expression von CXCR-1 und CXCR-2 auf Neutrophilen	67
3.2.4. Modulation der transendothelialen Migration von Neutrophilen durch PF-4	69
3.2.5. Mechanismus der PF-4-abhängigen Inhibition der transendothelialen Migration	72
3.3. Bildung von NAP-2 in einer physiologischen Bedingungen angenäherten Situation	73
3.3.1. Entstehung von NAP-2 in Kokulturen von Thrombozyten und Neutrophilen in Gegenwart von FCS oder autologem Plasma	74
3.3.2. NAP-2-Entstehung bei Inhibition der Thrombus-Bildung	76
4. DISKUSSION	78
5. ZUSAMMENFASSUNG	89
6. LITERATURVERZEICHNIS	91
7. ANHANG	102
7.1. Geräte	102
7.2. Computerprogramme	103
7.3. Chemikalien	103
7.4. Labormaterialien	104
7.5. Puffer, Lösungen und Medien	105

Abkürzungen

α -	<i>anti-</i> (gegen)
β -TG	β -Thromboglobulin
β -TG Ag	β -Thromboglobulin Antigen
Ala	Alanin
BCA	Bicinchoninsäure
BOC	N-t-BOC-Ala-Pro-NorVal-p-Chlorothiobenzylester
BSA	Rinderserumalbumin
C5a	aktivierte fünfte Komponente des Komplementsystem
CDS	<i>Cell Dissociation Solution</i>
CK β 8	CXC-Chemokin β 8
CTAP-III	Bindegewebe-aktivierende Peptid-III (<i>connective tissue-activating peptide-III</i>)
CXCR-1	CXC-Chemokin-Rezeptor Typ 1
CXCR-2	CXC-Chemokin-Rezeptor Typ 2
DAB	Diaminobenzidin
Dil-Puffer	Dilution-Puffer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelzellen
EC ₅₀	erforderliche Konzentration zur Induktion einer halbmaximalen Antwort
ECGF	<i>endothelial cell growth factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELR	Glutamin-Leucin-Arginin-Sequenzmotiv
ENA-78	<i>epithelial-derived neutrophil attractant-78</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fMLP	formyl-Methionyl-Lysyl-Phenylalanin
g	Erdbeschleunigung
GCP-2	<i>granulocyte chemotactic protein-2</i>
GPAP	Glycyl-Prolyl-Arginyl-Prolin, synthetisches Peptid

G α -Rig-POD	Ziege- α -Kaninchen-IgG, POD-konjugiert
h	Stunden
HBSS	Hanks' gepufferte Kochsalzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hexa	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
IL-1	Interleukin 1
IL-8	Interleukin 8
IP-10	<i>Interferon-γ inducible protein-10</i>
I-TAC	<i>Interferon-γ inducible T Cell alpha chemoattractant</i>
kDa	Kilodalton
LFA-1	<i>leukocyte function-associated molecule-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
M199	Medium 199
MAC-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MGSA	<i>melanocyte growth stimulatory activity</i>
MIG	<i>monokine induced by Interferon-γ</i>
min	Minuten
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NAP-2	Neutrophile aktivierendes Peptid 2 (<i>neutrophil-activating peptide 2</i>)
OPD	o-Phenylendiamin
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBP	basisches Plättchenprotein (<i>platelet basic protein</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-D	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco
PECAM-1	<i>platelet-endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PF-4	Plättchenfaktor 4

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RS	Rinderserum
RT	Raumtemperatur
R α - β TG	Kaninchenantiserum gegen β -TG Ag
s	Sekunden
SDF-1	<i>B cell-attracting chemokine 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sLe ^a	Sialyl-Lewis ^a
sLe ^X	Sialyl-Lewis ^X
SV	Säulenvolumina
TFA	Trifluoressigsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
v/v	volume per volume
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>very late antigen 4</i>
vWF	von Willebrandt Faktor
TEMED	N'N'N'N'-Tetraethylendiamin
w/v	weight per volume

Internationaler Buchstabenkurzcode der Aminosäuren

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