

Aus dem Institut für Biochemie  
Direktor Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

VORKOMMEN UND PROTEOLYTISCHE REGULATION  
VON CXCL16 IN DER HAUT

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

vorgelegt von  
FREDERIC ADAMSKI  
aus  
Itzehoe

Kiel 2009

1. Berichterstatter	: PD Dr. rer. nat. Andreas Ludwig
2. Berichterstatter	: Prof. Dr. med Dr. rer. nat. Ehrhardt Proksch
Tag der mündlichen Prüfung	: 12. April 2010
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	: 12. April 2010

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Entzündungsreaktion .....	2
1.2	Chemokine .....	4
1.2.1	Die Nomenklatur der Chemokine.....	4
1.2.2	Chemokinrezeptoren .....	6
1.2.3	Das CXCL16 .....	6
1.3	Die Disintegrin- ähnlichen Metalloproteinasen.....	8
1.4	Fragestellung .....	9
2.	Material und Methoden .....	11
2.1.	Material .....	11
2.1.1.	In der Zellkultur .....	11
2.1.1.1.	Die verwendeten Zelllinien.....	11
2.1.1.2.	Zellkulturmedien und –zusätze.....	11
2.1.1.3.	Zellkulturschalen und –platten .....	12
2.1.2.	Verwendete Inhibitoren.....	12
2.1.3.	Verwendete Stimulantien.....	13
2.1.4.	Verwendete Antikörper .....	14
2.1.5.	Oligonukleotide.....	14
2.1.6.	Gelelektrophorese und <i>Western Blot</i> .....	15
2.1.7.	Chemikalien und Gebrauchsgegenstände.....	15
2.1.8.	Geräte.....	15
2.2.	Methoden.....	16
2.2.1.	Kulturbedingungen der Zelllinien.....	16
2.2.2.	UV- Bestrahlung.....	16
2.2.3.	Versuche zur Freisetzung von CXCL16 bei kultivierten Keratinozyten .....	17
2.2.4.	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)</i> .....	17
2.2.4.1.	hCXCL16 <i>Enzyme linked immuno Sorbent assay</i> .....	18
2.2.4.2.	mCXCL16 <i>Enzyme linked immuno Sorbent assay</i> .....	19
2.2.4.3.	Auswertung der Mikrotiterplattenphotometer- Daten.....	19
2.2.5.	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- Page) .....	20
2.2.6.	<i>Western Blot</i> .....	20
2.2.7.	Durchflusszytometrie .....	21
2.2.8.	RNA- Isolierung, Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23

2.2.9.	Polyacrylamid- Gelelektrophorese für DNA/RNA.....	25
3.	Ergebnisse .....	27
3.1.	Expression von CXCL16 in der Haut .....	27
3.2.	Das CXCL16- <i>Shedding</i> ist durch Metalloproteinaseinhibitoren inhibierbar	31
3.3.	Keine signifikante Regulation der CXCL16- Expression in Keratinozyten durch die Zytokine TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ und IL- 4.....	37
3.4.	ADAM10- vermittelte Induzierbarkeit von CXCL16 <i>Shedding</i> durch Ionomycin .....	38
3.5.	UV- B hat Einfluss auf das <i>Shedding</i> von CXCL16 .....	44
3.6.	Der Rezeptor CXCR6 befindet sich in der Dermis, aber nicht in der Epidermis .....	49
4.	Diskussion.....	51
4.1.	CXCL16 wird von Keratinozyten konstitutiv exprimiert.....	51
4.2.	CXCL16- Expression kann in Keratinozyten durch Mediatoren nicht hoch reguliert werden .....	52
4.3.	ADAM10 ist die regulierende Protease für CXCL16 in Keratinozyten.....	52
4.4.	Biologische Relevanz des CXCL16 in Keratinozyten .....	55
5.	Zusammenfassung.....	58
6.	Literaturverweise.....	59
7.	Anhang .....	68
7.1.	Rezepte .....	68
7.2.	Geräte, Labormaterialien und Chemikalien.....	69
7.2.1.	Geräte.....	69
7.2.2.	Labormaterialien.....	69
7.2.3.	Verwendete Chemikalien .....	70
7.3.	Danksagung.....	71
7.4.	Lebenslauf .....	72
7.5.	Eidesstattliche Erklärung.....	74

## Abkürzungsglossarium

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CAM	<i>Cellular Adhesion Molecule</i>
cAMP	zyklisches Adenosin- Monophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	complementäre DNA
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxy- Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMEM- Medium	<i>modified dulbecco eagle medium</i>
DTT	Dithiothreitol
E- Selektin	Endothelzellen- Selektin
ECV- Zellen	<i>human urinary bladder carcinoma cell line</i>
EDTA	N, N, N, N -Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FSC	<i>Forward scatter</i>
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
GDP	Guanidin- Diphosphat
G- Protein	nukleotid bindendes Protein
GDP	Guanidin- Diphosphat
GTP	Guanidin- Triphosphat
h	Stunde
HaCaT	<i>human keratinocyte cell line</i>
hCXCL16	humanes CXC- Chemokin Ligand 16
HEK- Zellen	<i>human embryonic kidney- cell</i>
CD	<i>intercellular domain</i>
ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecule</i>
IFN - $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin- 6- Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositol- 1,4,5- trisphosphat
kDa	Kilodalton
L- Selektin	Leukozyten- Selektin
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mCXCL16	murines CXCL16
MF	Mittlere Fluoreszenz
min	Minuten
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger- Ribonukleinsäure</i>
NK- Zellen	Natürliche Killer- Zellen
oxLDL	<i>oxidised low density lipoprotein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline containing tween</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol- 4,5- Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol- 12- Myristat- 13- Acetat
PrP	<i>prion precursor protein</i>
P- Selektin	Plättchen- Selektin
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	<i>Real- Time Polymerase Chain Reaction</i>
SSC	“Side Scatter”
SVMP	<i>Snake Venom Metalloproteinase</i>
TACE	<i>TNF- α- Converting Enzyme</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF α	Tumor- Nekrosefaktor α
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

#### Abkürzungen für Aminosäuren:

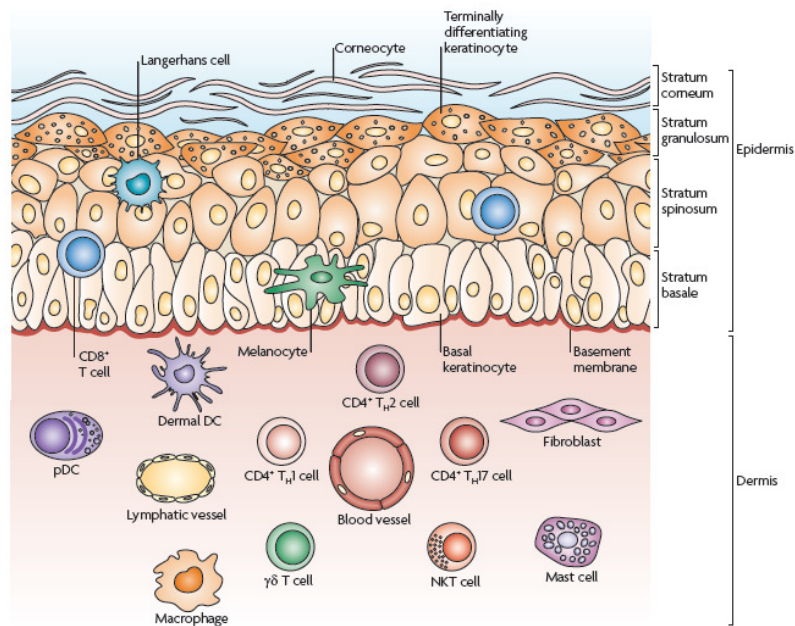
<b>A</b> Alanin (Ala)	<b>G</b> Glycin (Gly)	<b>M</b> Methionin (Met)	<b>S</b> Serin (Ser)
<b>C</b> Cystein (Cys)	<b>H</b> Histidin (His)	<b>N</b> Asparagin (Asn)	<b>T</b> Threonin (Thr)
<b>D</b> Asparaginsäure (Asp)	<b>I</b> Isoleucin (Ile)	<b>P</b> Prolin (Pro)	<b>V</b> Valin (Val)
<b>E</b> Glutaminsäure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

## 1. Einleitung

Die Haut ist das größte menschliche Organ mit einer Gesamtoberfläche von bis zu 2m<sup>2</sup>, das den Körper gegen die Umwelt abgrenzt. Ihr werden wichtige Funktionen zugeteilt, zum Beispiel dem Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen wie Verletzung, Hitze, Kälte oder UV-Strahlung und sie ist außerdem ein Ort der Immunabwehr. Sie schützt den Körper vor dem Eindringen von Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten. Zur Erfüllung ihrer spezifischen Aufgaben unterscheidet sich die Haut regional in ihrer Dimensionierung der einzelnen Schichten sowie in ihrer Beschaffenheit [1].

Die Haut lässt sich in Epidermis, Dermis und Subkutis einteilen. Bei der Epidermis handelt es sich um ein verhorntes mehrschichtiges Plattenepithel, dessen Zellen Keratinozyten genannt werden. Die Dermis besteht aus Bindegewebe und enthält die terminalen Blutgefäße. Die Epidermis selbst enthält keine Blutgefäße. Die Epidermis und Dermis werden als Kutis zusammengefasst und sind in der dermo-epithelialen Verbindungszone eng miteinander verzahnt. Die Subkutis stellt die Verbindung zwischen der Kutis und tiefer liegenden Strukturen, wie z.B. Faszien, her und dient als Verschiebeschicht und Druckpolster. Die Epidermis besteht aus vier Schichten: dem *Stratum basale*, dem *Stratum spinosum*, dem *Stratum granulosum* und dem *Stratum corneum*. Im *Stratum basale* liegen die epidermalen Stammzellen, die direkt der Basalmembran in der dermo-epithelialen Verbindungszone anliegen, und ihre Abkömmlinge in die nächst höhere Schicht, dem *Stratum spinosum*, abgeben. Charakteristisch für das *Stratum spinosum* sind die Desmosomen-Kontakte. Ab dem *Stratum granulosum* sind Keratohyalin granula zu erkennen, die für den Verhornungsprozess verantwortlich sind. Auf dem Weg zum *Stratum corneum* verliert die Zelle ihren Zellkern und ihre Zellorganellen, bis sie schließlich auf Ihre Membran und einem mit Keratin gefüllten Raum reduziert ist. Das *Stratum corneum* besitzt ca. 75- 100 Zelllagen. Diese Hornschuppen werden durch Desmosomen und Lipide zusammengehalten. Durch mechanische und chemische Einflüsse kommt es zur Abschürfung der Hornschuppen.

Neben den Keratinozyten sind in der *Epidermis* pigmentbildende Melanozyten, antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen und die somatosensorischen Merkelzellen anzutreffen. Als nicht ortständige Zellen finden sich Mastzellen, Makrophagen und Lymphozyten als Vertreter des Immunsystems in der *Dermis*.



**Abb.1.1 Strukturelle Zeichnung der Haut** mit ihren einzelnen Zellarten [102].

In allen Hautschichten kann es zu pathogenen genetischen Defekten und Erkrankungen kommen. Beispiele hierfür sind die *Ichthose* (Fischschuppenkrankheit), *Epi-dermolysis bullosa* oder das *bullöse Pemphigoid* [2]. Kommt es zu kleinsten Verletzungen und Schädigungen der Haut, wird die immunologische Abwehr sofort aktiviert. Dies führt zur Induktion von Reparaturmechanismen und Schutzmechanismen, bei denen Zytokine die Prozesse wie Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten steuern [3; 4, 5].

In diversen Untersuchungen wurden Keratinozyten als wichtige Produzenten von Chemokinen in der Haut ausgemacht [5; 6-8; 9]. Chemokine können in der Haut Funktionen als autokrine und parakrine Mediatoren übernehmen. Unter anderem sind TNF-  $\alpha$ , IL-6 und IL-20 als Mediatoren in der Haut anzutreffen. Sie sind in gesunder sowie in erkrankter Haut für die Homöostase, für inflammatorische Prozesse, für die Kontrolle des Zellwachstums, die Wundheilung als auch für die Entstehung von Hauttumoren von Bedeutung [5; 6-8].

## 1.1 Die Entzündungsreaktion

Eine Entzündung ist eine Reaktion des Körpers auf Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, aber auch auf die Entartung körpereigener Zellen (Tumoren) oder immunologische Fehlleistungen wie Autoimmunreaktionen und Allergien



[1]. Die klassischen Kardinalsymptome einer Entzündung, beschrieben von Celsus (30- 38 n. Chr.) und Galen (130- 200 n. Chr.), sind Wärme (*calor*), Schmerz (*rumor*), Rötung (*dolor*), Schwellung (*tumor*) und die eingeschränkte Funktion (*functio laesa*) [10]. Der Entzündungsvorgang ist ein komplizierter Prozess, in dem Zellen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems, z.B. T- Zellen, NK- Zellen oder Makrophagen, aktiv an den Ort der Entzündung geleitet werden, wofür sie zunächst die Barriere zwischen Blutgefäß und dem darunter liegenden Gewebe überwinden müssen.

Hierbei spielen spezielle, in der Regel sezernierte Proteine, die Chemokine, eine entscheidende Rolle. Sie werden von dem entzündeten Gewebe verstärkt produziert und führen neben der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen des Endothels zu der gerichteten Wanderung (Chemotaxis) der Immunzellen an den Entzündungsherd. In Abbildung 1.2 werden die Rekrutierung und die Diapedese durch die Endothelschicht schematisch dargestellt.

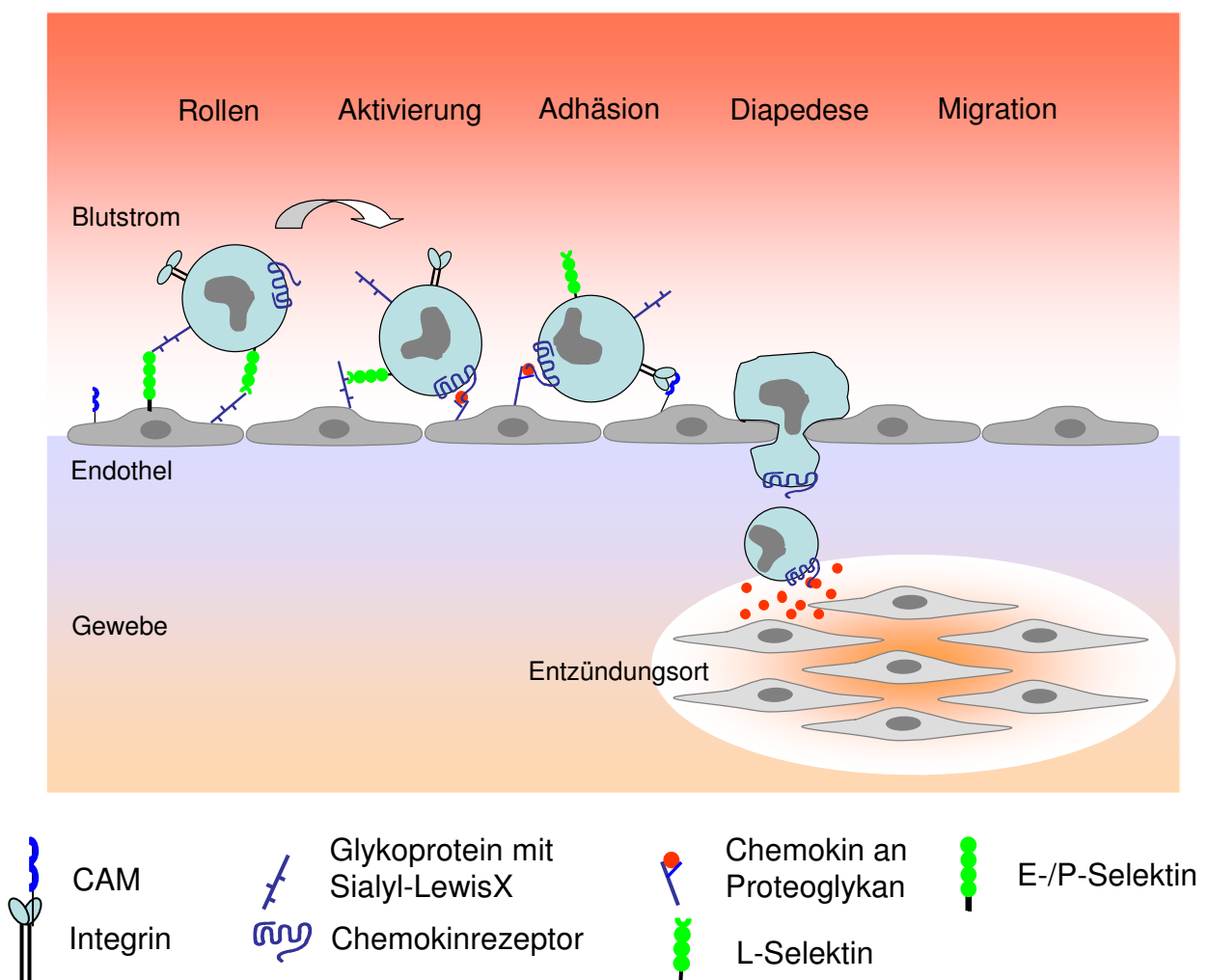


Abb. 1.2 Modell der Leukozytenrekrutierung.

Während des Entzündungsprozesses kommt es infolge einer Volumenvergrößerung des Gefäßes zu einer Verringerung der Fließgeschwindigkeit des Blutes im betroffenen Areal [11]. Die Endothelzellen des Blutgefäßes werden aktiviert, wodurch sie verstärkt Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Zu diesen gehören Selektine wie das Plättchen (P)– Selektin, das durch die Komplementfaktoren C3a und C5a, durch das Leukotrien B<sub>4</sub> und durch Histamin aktiviert wird und das Endothel (E)– Selektin, das durch Lipopolysaccharide (LPS) und proinflammatorische Zytokine wie TNF-  $\alpha$  und IFN-  $\gamma$  aktiviert wird. Ein weiteres Selektin, das Leukozyten (L)– Selektin wird auf den Leukozyten exprimiert, dessen Expression durch die Zytokine IL-1, IL-2, IL-5 und IL-6 heraufreguliert wird [10-12]. Die Leukozyten gehen über ein Glykoprotein mit Sialyl- LewisX, das sich auf der Oberfläche der Leukozyten befindet, eine Interaktion mit den Selektinen ein. Diese Bindung ist allerdings relativ schwach, so dass es zu einer fortlaufenden Aufhebung und Neubildung der Interaktion kommt. Diese erste Phase der Leukozytenrekrutierung wird als „Roller“ bezeichnet. Im nächsten Schritt binden Chemokinrezeptoren der Leukozyten freigesetzte Chemokine des Endothels. Es kommt zu einer Ca<sup>2+</sup>- abhängigen Aktivierung von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche, die daraufhin mit den *Cellular Adhesion Molecules* (CAMs) des Endothels (z.B. *Integrin-Liganden intercellular adhesion moleküle (ICAM-1)* und *Vascular cellular adhesion moleküle – 1 (VCAM-1)*) interagieren und somit zu einer relativ stabilen Adhäsion der Leukozyten führen. Im letzten Schritt erfolgt die Diapedese, welche sich, vermutlich in Abhängigkeit von der Natur der beteiligten Zellen, sowohl durch den interzellulären Raum als auch durch die Zellen hindurch vollziehen kann.

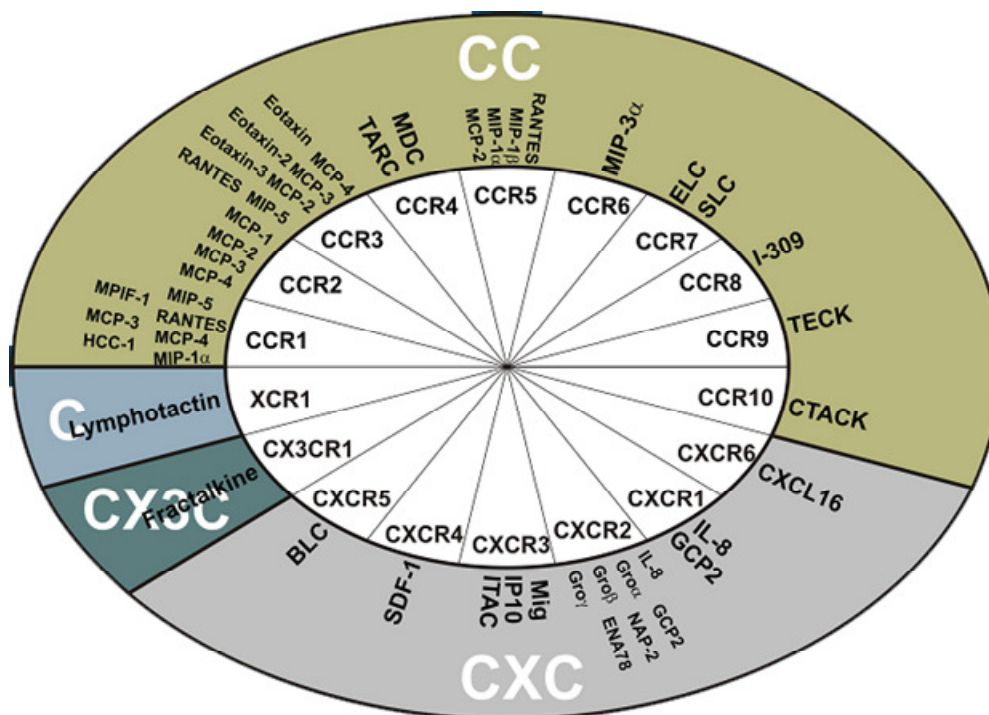
## 1.2 Chemokine

### 1.2.1 Die Nomenklatur der Chemokine

Chemokine wirken als parakrine und autokrine Mediatoren in gesundem und erkranktem Gewebe und tragen hier zu physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen bei. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der gerichteten Zellwanderung in lymphatischen Organen, bei der Zellrekrutierung im Verlauf von infektiösen Prozessen sowie in einzelnen Fällen bei der Kontrolle der Zellproliferation [5; 6- 8]. Es handelt sich hierbei um eine ca. 50 Mitglieder umfassende Gruppe meist löslicher basischer Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 8-12kDa [13-17]. Allerdings gibt es zwei besondere Vertreter innerhalb der Gruppe der Chemokine, das CXCL16

und das Fraktalkin (CX3CL1), welche sowohl in einer löslichen als auch in einer membrangebundenen Form vorkommen [18-20]. Eine Einteilung der Chemokinfamilie kann nach strukturellen oder funktionalen Gesichtspunkten erfolgen.

Strukturell lassen sich abhängig von der Anordnung des ersten bzw. der ersten beiden konservierten Cystein- Aminosäureresten (C) vier charakteristische Gruppen bilden: C- (einzeln), CC- (nebeneinander), CXC- (von einer weiteren Aminosäure getrennt) und CX3C- Chemokine (von drei Aminosäuren getrennt) [15; 21]. Die Liganden werden mit einem L (z.B. CXCL16), die Rezeptoren mit einem R (z.B. CXCR6) gekennzeichnet.



**Abb.1.3 Unterteilung der Chemokine (R&D- Systems, St. Leon- Roth).** In dieser Abbildung sind alle bisher bekannten Chemokine kreisförmig in strukturelle Familien unterteilt. Die Grundlage für die Unterteilung sind die charakteristische Position und die Abstände der Cysteine.

Röntgenstrukturanalysen und NMR- spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass Chemokine eine charakteristische Struktur besitzen [22-24]. Die Tertiärstruktur besteht aus einem ungeordneten N- Terminus und drei antiparallel verlaufenden  $\beta$ - Faltblattsträngen, gefolgt von einer C- terminalen  $\alpha$ - Helix [25]. Stabilisiert wird die Struktur durch bis zu zwei Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten [26]. Chemokine können als Monomere und Dimere vorkommen. Die Quartärstruktur hängt unter anderem vom pH- Wert, der Phosphat- und Sulfatkonzentration ab [27].

Für die funktionelle Unterscheidung spielen physiologische Kriterien die entscheidende Rolle. Man unterscheidet zwischen inflammatorischen oder induzierbaren und homöostatischen oder konstitutiven lymphoiden Chemokinen [28-30]. Inflammatorische Chemokine sind an der Rekrutierung von Immunzellen wie B- oder T- Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten beteiligt. Homöostatische Chemokine sind für die Steuerung der entzündungsunabhängigen Migration von Leukozyten in peripheres Gewebe, sowie an der Hämatopoese und der Einleitung der adaptiven Immunantwort in den primären (Knochenmark und Thymus) und den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und mukosa- assoziiertes lymphatisches Gewebe) verantwortlich [29]. Weiterhin gibt es Chemokine, die sowohl inflammatorisch als auch homöostatisch wirken können. Sie werden duale Chemokine genannt [29].

## 1.2.2 Chemokinrezeptoren

So wie ihre Liganden werden die Chemokin- Rezeptoren in CC-, CXC-, CX3C- und XC- Rezeptoren unterteilt. Die ca. 20 bis heute bekannten Chemokinrezeptoren gehören alle zu den heptahelikalen G- Protein- gekoppelten Rezeptoren, auch Serpentinrezeptoren genannt. Es handelt sich um Proteine mit einer Länge von 400-500 Aminosäuren, die ein Molekulargewicht zwischen 40-60kDa besitzen. Die Tertiärstruktur besitzt sieben Transmembrandomänen (heptahelical = aus sieben Helices aufgebaut), welche durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind, wobei der N- Terminus extrazellulär und der C- Terminus intrazellulär angeordnet ist. Von besonderer Bedeutung ist die große intrazelluläre Schleife zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne, die für die Interaktion mit dem heterotrimeren G- Protein verantwortlich ist.

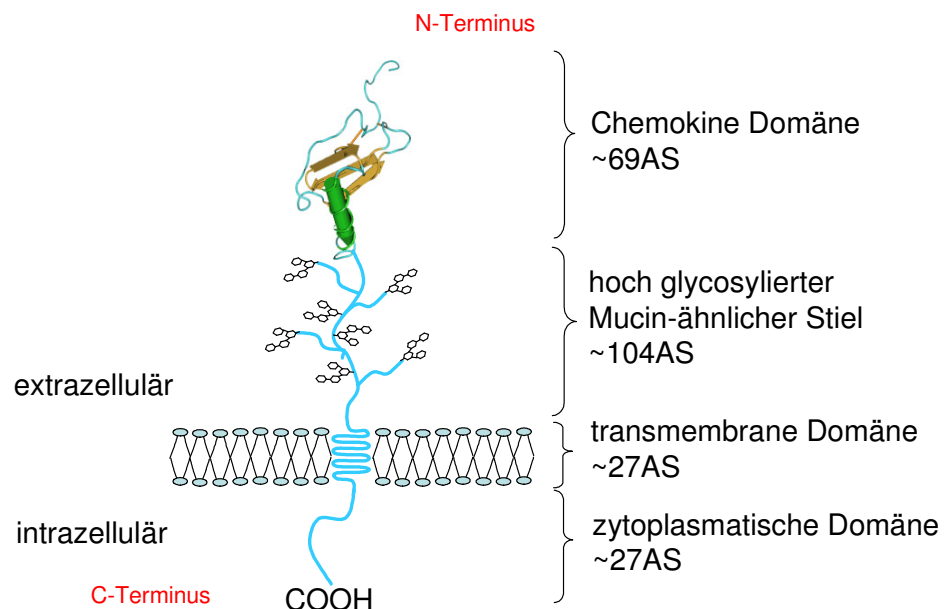
Die Signaltransduktion wird durch Bindung des Liganden an seinen Rezeptor auf der extrazellulären Seite ausgelöst. Es kommt am intrazellulären C- Terminus, an der ein Guanin- nukleotid bindendes Protein (G- Protein) gebunden ist, zur Aktivierung der Proteinkinase C. Die über Gi- Proteine vermittelte Signaltransduktion kann durch das Pertussis- Toxin aus *Bordatella pertussis* blockiert werden. Durch dieses Toxin verliert die Zelle ihre Fähigkeit zur Chemotaxis [31].

## 1.2.3 Das CXCL16

Das CXCL16 sowie das Fraktalkin (CX3CL1) sind bis heute die einzigen bekannten Chemokine, die in gelöster sowie in membranständiger Form vorkommen [19-20]. Bei beiden Chemokinen handelt es sich um Typ-I- Transmembranproteine. Das

CXCL16 wird auch als Scavenger- Rezeptor bezeichnet, da es die Fähigkeit besitzt, oxidiertes *Low Density Lipoprotein* (LDL) zu binden und aufzunehmen [32-33].

Die extrazelluläre N- terminale Domäne des CXCL16 ist ca.10kDa groß und zeigt die typischen strukturellen Merkmale der Chemokine. Der Chemokindomäne folgt eine stark glykolysierte Mucin- ähnliche Region, deren Länge ungefähr 104 Aminosäuren beträgt und einen hohen Anteil an Serin, Prolin, Glycin und Threonin besitzt. Dieser mucinähnlichen Region folgt die Transmembrandomäne, welche ca. 21-27 Aminosäuren umfasst [19; 32; 34-35]. Der intrazelluläre C- Terminus besitzt etwa eine Länge von 27-28 Aminosäuren (Abbildung 1.4).



**Abb. 1.4 Schematische Darstellung von CXCL16 in der transmembranständigen Form.** Rechts sind die einzelnen Regionen mit ihrer spezifischen Größe angegeben.

CXCL16 wurde zum ersten Mal im Jahr 2000 auf Antigen- präsentierenden Zellen nachgewiesen [19; 32-34]. Bis heute wurde dieses Typ I- Transmembranmolekül auf dendritischen Zellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen sowie im Gewebe von Leber, Nieren, Lunge und Gehirn und auf gingivalen Fibroblasten beschrieben [32; 36-42]. In Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Gliazellen wurde das Chemokin nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen [36; 43-44].

Für das CXCL16 sind verschiedene Funktionen bekannt. Das CXCL16 ist fähig, oxidiertes LDL zu binden, welches eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose spielen soll. In einer weiteren Studie über atherosklerotische Gefäßerkrankungen wurde CXCL16 auf lipidbeladenen Makrophagen gefunden, die sich in der atherosklerotischen Intimaschicht des Gefäßes befanden [45-46]. Weiterhin bindet CXCL16 an den Chemokinrezeptor CXCR6, der auf Makrophagen und Leukozyten exprimiert wird. CXCL16 vermittelt über die Interaktion mit seinem Rezeptor einen stabilen Zell- Zell- Kontakt [19; 34; 47-50].

CXCL16 wird durch proteolytische Spaltung von der membranständigen Form in eine lösliche Form überführt. Dieser Vorgang wird auch *Shedding* genannt und die beteiligten Proteasen werden als Sekretasen bezeichnet. Das *Shedding* von CXCL16 wurde bisher in murinen und humanen Fibroblasten sowie humanen Endothelzellen untersucht, wobei sich herausstellte, dass an seiner proteolytischen Freisetzung Metalloproteinasen der Adamalysin- Familie beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass für die basale oder auch „konstitutive“ CXCL16- Spaltung hauptsächlich ein Vertreter der disintegrin- ähnlichen Metalloproteinasen, nämlich ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase- 10), verantwortlich ist [45; 52]. Zudem konnte in transfizierten Fibroblasten die Freisetzung von CXCL16 durch Phorbol- 12- Myristate-13- Acetat (PMA) erhöht werden. An diesem Vorgang ist sehr wahrscheinlich auch ADAM17 beteiligt [36; 43]. Das lösliche CXCL16 wirkt als chemotaktischer Stimulus und aktiviert die Migration CXCR6- tragender Zellen, wie zum Beispiel die bestimmter T-Zell- Populationen oder Plasmazellen des Knochenmarks [19; 53-54]. Über die Expression von CXCL16 sowie seines Rezeptors CXCR6 in der Haut war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nichts bekannt.

### **1.3 Die Disintegrin- ähnlichen Metalloproteinasen**

Disintegrin- ähnliche Metalloproteinasen (ADAM: **A** Disintegrin **A**nd **M**etalloproteinase), gehören zum Typ I der membrangebundenen Proteine und sind in vielen Organismen unterschiedlicher Entwicklungsstufen zu finden (z.B. in Hefen, in der Fruchtfliege *Drosophila* bis hin zum Menschen) [55-56]. Mit den Matrixmetalloproteinasen (MMP) und den Schlangengiftproteinasen (SVMP) bilden sie die Superfamilie der Metzinkine [57-58]. Sie sind zinkabhängig und für die proteolytische Spaltung von membrangebundenen Proteinen zuständig.

Zwei der wichtigsten Vertreter sind ADAM10 und ADAM17. ADAM10, aus Rinderhirn isoliert, zunächst als „myelin basic protein degrading enzyme“ beschrieben und nach seiner Klonierung als ADAM10 klassifiziert, ist hauptsächlich für konstitutives *Shedding* verantwortlich [59-60]. Das *Shedding* durch ADAM10 konnte zum Beispiel beim Prion Protein (PrP), beim Notch- 1- Rezeptor, CD44 und beim IL-6- Rezeptor beschrieben werden [61-64]. ADAM17 war das erste bekannte ADAM, das an *Shedding*-Prozessen beteiligt ist. Es spielt eine Rolle bei induzierten proteolytischen Spaltungen, zum Beispiel bei der Abspaltung des Tumor-Nekrose-Faktors  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) von der Zelloberfläche, und wird daher auch als *TNF-  $\alpha$ - converting enzyme* (TACE) bezeichnet [55]. Mittlerweile weiß man, dass TACE unter anderem Zytokine wie das CXCL1 und TRANCE, Rezeptoren wie TNF-  $\alpha$ - Rezeptor, IL-6- Rezeptor, CD30, CD40, CD44, Notch-1- Rezeptor, PrP, Notch Liganden Delta-1, das L- Selektin, ICAM, VCAM und das neuronale Adhäsionsmolekül L1 schneidet [61; 66-73]. Proteasen, Zytokine und Chemokine bilden gemeinsam ein komplexes Netzwerk. Kommt es zu einer Gleichgewichtsverschiebung, können in der Haut Entzündungen und Erkrankungen hervorgerufen werden. Beispielsweise kommt es bei einer Erhöhung der Aktivität des *ADAM17- Sheddings* zu einer erhöhten Freisetzung des TNF-  $\alpha$  und der TNF- $\alpha$ - Rezeptoren p55 und p75. Diese ADAM17- Substrate wurden in psoriatisch erkrankter Haut nachgewiesen [74-76].

## 1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte das Vorkommen und die proteolytische Regulation von CXCL16 in der Haut untersucht werden. Dabei sollte zunächst in murinen und humanen Keratinozyten- Zelllinien die Expression des Chemokins sowohl auf Transkript (mRNA)- Ebene mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) als auch auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistochemie, des *Enzyme- linked Immunosorbent Assay* (ELISA), der Durchflusszytometrie und der *Western Blot*- Technik analysiert werden. Es sollte außerdem geklärt werden, ob CXCL16 – ähnlich wie das verwandte Fraktalkin - durch entzündungsfördernde Zytokine wie TNF- alpha oder IFN-gamma heraufreguliert werden kann.

Es sollte hiernach untersucht werden, ob von Hautzellen produziertes CXCL16 durch Protease- Aktivität in eine lösliche, möglicherweise funktionale Form überführt werden kann und es so einem *Sheddingmechanismus* unterliegt. Durch den Einsatz allgemeiner und spezifischer (Metallo)- Proteinase-Inhibitoren sollten Hinweise auf die

Identität der beteiligten Proteasen erhalten werden. Außerdem sollten die Wirkungen verschiedener Stimuli wie z.B. der PKC aktivierende Phorbolster PMA, das Calcium-Ionophor Ionomycin oder auch UV-Strahlung auf die Freisetzung von CXCL16 untersucht werden. Schließlich war ein weiteres Ziel, mittels PCR und Immunhistochemie das Vorkommen des CXCL16-Rezeptors CXCR6 in der Haut zu studieren und somit erste Hinweise für die möglichen Funktionen von CXCL16 in der Haut zu erhalten.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. In der Zellkultur

##### 2.1.1.1. Die verwendeten Zelllinien

Humane embryonale Nierenzellen der Linie HEK293 (human embryonic kidney cells) wurden von Herrn Prof. Dr. med. Martin Oppermann (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Stabile, den Rezeptor CXCR6 exprimierende HEK293-Zellen wurden von Alexander Schulte (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durch Transfektion von HEK293-Zellen mit CXCR6 cDNA unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt. Als Expressionsvektor diente pcDNA3.1 neo (+) (Invitrogen, Karlsruhe). Die Selektion positiver Klone erfolgte mit Hilfe des Selektionsmarkers Geneticin (1000µg/ml) (Sigma-Altrich, St. Louis, USA).

Ebenfalls wurde die Zelllinie ECV-304 verwendet, eine Zelllinie, die früher unkorrekter Weise als Endothelzelllinie beschrieben wurde, später aber als Blasenkarzinomzelllinie mit endothelialen Merkmalen identifiziert wurde. Stabile CXCL16 ECV-Zellen wurden von Christian Hundhausen (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durch Transfektion von Wildtyp ECV304 mit humaner CXCL16 cDNA unter Verwendung des Transfektionsreagenz FuGENE (Roche, Mannheim) hergestellt. Für die Selektion positiver Klone wurde wie bei den HEK293-CXCR6-Zellen der Selektionsmarker Geneticin (1000µg/ml) (Sigma-Altrich, St. Louis, USA) verwendet.

Die humane Keratinozyten HaCaT-Zelllinie wurde von Dr. Fusenig (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die HaCaT-Zelllinie ist eine spontan transformierende humane Zelllinie aus gesundem adulten Epithelgewebe mit vollständiger epithelialer Differenzierungskapazität. Es ist die erste humane Keratinozyten-Zelllinie, die sich zur Erforschung der Keratinisationsregulation humaner Zellen eignet. Die murine Keratinozyten PAM212-Zelllinie stellte Frau Dr. Schwarz, Dermatologie, Uni Kiel, zur Verfügung.

##### 2.1.1.2. Zellkulturmedien und -zusätze

*Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640)-Medium (PAA Laboratories, Pasching (A)) wurde für die Kultivierung der PAM212-Zelllinie verwendet, für die Kultivierung der HaCaT-, HEK293- und ECV-Zelllinien das DMEM-Medium (dulbecco modified eagle medium) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Zusätzlich

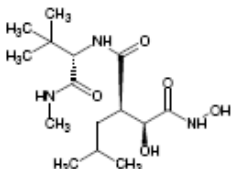
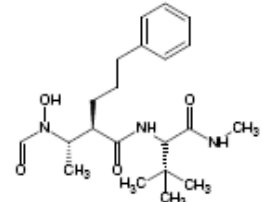
wurden fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und ein Gemisch aus PenicillinG- Natriumsalz und Streptomycinsulfat (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gegen mikrobielle Kontaminationen eingesetzt. Zur Ablösung der HaCaT- und PAM212- Zellen vom Kulturschalenboden kam Trypsin- EDTA (Invitrogen, Carlsbad, USA) zum Einsatz.

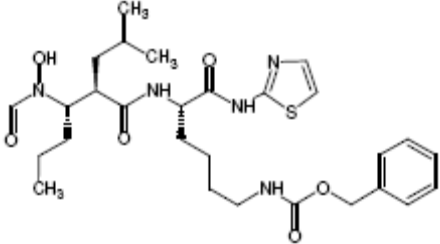
### 2.1.1.3. Zellkulturschalen und –platten

Alle verwendeten Zelllinien wurden in bakteriologischen Kulturschalen kultiviert (Sarstedt, Nümbrecht).

### 2.1.2. Verwendete Inhibitoren

Die in Tabelle 2.1 angegebenen Inhibitoren kamen während der Inhibitionsversuche zur Verwendung. Deren Lagerung erfolgte bei +4°C in steril filtriertem DMSO als 10mM Stammlösung.  $K_i$  beschreibt die Bindungsaffinität des verwendeten Inhibitors an das Enzym, bei der eine halbmaximale Hemmung auftritt.  $IC_{50}$  ist die Inhibitionskonzentration, bei der 50% der Enzyme inhibiert werden können [81].

Inhibitor	Inhibitionsklasse	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
<b>Marimastat</b> (GI245712X) N-[2,2-dimethyl-1-(methylcarbamoyl)propyl]-2-[hydroxy-(hydroxycarbamoyl)methyl]-4-methylpentanamide 	Metalloproteinase-inhibitor	GlaxoSmith Kline	10µM, 3,3µM
<b>GI254023X</b> (2R,3S)-3-(Formylhydroxyamino)-2-(2-phenyl-1-propyl) Butansäure [(1S)-2,2-dimethyl-1-methylcarbamoyl-1-propyl]amid 	ADAM10-Inhibitor $^2IC_{50}$ (ADAM17) =541 nM $IC_{50}$ (ADAM10) =5,3 nM $K_i = 5,3nM$	GlaxoSmith Kline	10µM, 3,3µM

Inhibitor	Inhibitionsklasse	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
<p><b>GW280264X</b>                      (2R,3S)-3-(Formyl-hydroxyamino)-2-(2-methyl-1-propyl)Hexansäure-1-(1,3-thiazol-2-methylcarbamoyl-1-pentyl] amid</p> 	ADAM10- und ADAM17-Inhibitor $IC_{50}(ADAM17) = 8,0nM$ $IC_{50}(ADAM10) = 11,5nM$ $K_i = 8,0nM$	GlaxoSmith Kline	10 $\mu$ M, 3,3 $\mu$ M

**Tabelle 2.1. Verwendete Inhibitoren mit Strukturformel, Inhibitionsklasse, seinem Hersteller und der eingesetzten Konzentration**

### 2.1.3. Verwendete Stimulantien

Die in Tabelle 2.2 genannten Stimulantien wurden für Stimulationsversuche verwendet.

Stimulant	Hersteller und Kat.-Nr.	Verwendete Konzentration
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich	400ng/ml
Ionomycin 11,19,21-trihydroxy-22-[5-[5-(1-hydroxyethyl)-5-methyl-tetrahydrofuran-2-yl]-5-methyl-tetrahydrofuran-2-yl]-4,6,8,12,14,18,20-heptamethyl-9-oxo-docosa-10,16-diensäure	Calbiochem	1 $\mu$ M
TNF- $\alpha$	R&D Systems	20ng/ml
IFN- $\gamma$	R&D Systems	20ng/ml
IL-4	R&D Systems	20ng/ml

**Tabelle 2.2. Verwendete Stimulantien, mit Auflistung der Hersteller und der verwendeten Konzentration**

## 2.1.4. Verwendete Antikörper

Antigen	Spezifität	Herkunft	Verwendung	Konjugat	Hersteller + Kat.-Nr.	Verwendete Konzentration
hCXCL16	polyclonal	Ziege	ELISA	--	R&D Systems #AF0976	1µg/ml
hCXCL16	polyclonal	Kaninchen	<i>Westernblot/</i> FACs	--	PeproTech #500P200	0,5µg/ml
Kaninchen IgG		Ziege	Isotypkontrolle	POD	Jackson	0,16µg/ml
hCXCL16	polyclonal	Kaninchen	ELISA	Biotin	PeproTech #500P200Bi	150ng/ml
mCXCL16	Monoklonal	Ratte	FACS/ELISA		R&D Systems MAB503	3µg/ml/ 2µg/ml
mCXCL16	polyclonal	Ziege	ELISA	Biotin	R&D Systems	50ng/ml
Humanes IgG	Humanes IgG2	Maus	Isotypkontrolle	PE	R&D Systems #IC004P	1,25µg/ml
hCXCR6	hCXCR6 Rezeptor (Bonzo)	Maus	FACs	PE	R&D Systems #FAB699P	0,5µg/ml
Maus IgG	IgG schwere und leichte Kette	Ziege		POD	Pierce #31432	0,16µg/ml
Streptavidin	Biotin	Strep. aureus	ELISA	POD	Roche 1089 153	0,2µg/ml
Antiserum Schwein gegen Haase	polyclonal	Kaninchen	FACS	FITC	Dako Cytomation F 0054	1:75
Antiserum Ziege gegen Ratte	polyclonal		FACS	PE	Jackson	1:75
Beta-Aktin	Monoklonal	Maus	<i>Westernblot</i>		Abcam mAbcam8226	120ng/ml
hTACE	Polyclonal	Kaninchen	<i>Westernblot</i>		Chemikon AB19027	1µg/ml
hADAM10	Polyclonal	Kaninchen	<i>Westernblot</i>		B42.1	1:10000
anti-Maus-POD		Kaninchen	<i>Westernblot</i>	Peroxidase	Jackson 115-036-003	100ng/ml
Anti- Kaninchen- POD		Ziege	<i>Westernblot</i>	Peroxidase	Jackson 111-036-003	100ng/ml

**Tabelle 2.3. Verwendete Antikörper mit ihrer Spezifität, Herkunft, Verwendung, ihrem Konjugat, ihrem Hersteller + Katalognummer sowie ihrer verwendeten Konzentration.**

## 2.1.5. Oligonukleotide

Für die reverse Transkription wurden folgende Primer verwendet:

hCXCL16 – qPCR *forward*

5`- GAG CTC ACT CGT CCC AAT GAA – 3`

hCXCL16 – qPCR *reverse*

5`- GTC TGG CAG TTG GGC CTG A – 3`

hGAPDH – qPCR *forward*

5`- CAG AAC ATC ATC CCT GCC TCT A – 3`

hGAPDH – qPCR *reverse*

5`- TGA ACG GGA AGC TCA CTG G – 3`

hCXCR6 – qPCR *forward*

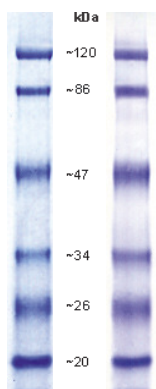
5`- ATG CCA TGA CCA GCT TTC A – 3`

hCXCR6 – qPCR *reverse*

5`- TAC CTG AGG GCC TGC CTT AA – 3`

### 2.1.6. Gelelektrophorese und *Western Blot*

Zur Detektion von DNA- Banden mittels Gelelektrophorese wurde das Mini- Sub Cell GT- System (BioRad, München) genutzt. Für die SDS- Gelelektrophorese wurde das Mini- Protean- 3- System genutzt, als Spannungsquelle das *PowerPac 200* (jeweils BioRad). Im *Western Blot* wurde die PVDF- Membran Hybond P (Amersham Bioscience, Freiburg) verwendet, als *Blotting*- Apparatur die Mini Trans- Blot Transferzelle (BioRad, München). Als Proteingrößenstandard wurde für das *Western Blot*- Verfahren der *Prestained Molecular Weight Marker* (SM0441) (Fermentas St. Leon- Rot) eingesetzt.



**Abb. 2.2 Prestained Molecular Weight Marker (SM0441) (Fermentas).**  
120, 86, 47, 34, 26, 20 kDa

### 2.1.7. Chemikalien und Gebrauchsgegenstände

Sämtliche verwendete Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von Cambrex (Verviers, B), Roth (Karlsruhe), PAA Laboratories (Pasching, A), Merck (Darmstadt) und Sigma (Seelze) bezogen. Hochreines Wasser wurde mit einer Wasseraufreinigungsanlage (Millipore, Billerica, USA) gewonnen. Kunststoffreaktions- und Kunststoffzentrifugationsgefäße sowie Mikropipettenspitzen wurden von den Firmen Greiner (Frickenhäusen), Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Nümbrecht) erworben. Enzympuffer und dNTPs wurden von der Firma Fermentas (St. Leon- Rot) bezogen.

### 2.1.8. Geräte

Alle Zellen wurden in einem Inkubator „Hera cell“ (Heraeus, Hanau) kultiviert. Alle Zellversuche wurden unter einer Sterilbank „Hera save“ (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Für die Durchflusszytometrie wurden zwei verschiedene Durchflusszytometer verwendet, das „FACS Scan“ mit der Software „Cell Quest“ und das „FACS Canto“

mit der Software FACS Diva (beide Geräte sowie die dazugehörige Software stammen von der Firma BD Bioscience, Heidelberg). Für den ELISA wurden Mikrotiterplatten der Firma Greiner (Frickenhausen) verwendet. Zu deren Analyse wurde das Mikrotiterplattenphotometer SCT Rainbow (Tecan, Crailsheim) genutzt. Des Weiteren wurden Zentrifugen vom Typ „Megafuge 2.0R“, „Biofuge pico“ und „Biofuge fresco“ von der Firma Heratus genutzt. Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Thermocycler „Robo Cycler Gradient 96“ (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet.

### **2.2. Methoden**

#### **2.2.1. Kulturbedingungen der Zelllinien**

Alle Zellen wurden in 10cm- Kulturschalen (Petrischalen) in 10ml RPMI- Medium oder DMEM- Medium in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Zusätzlich wurde dem Medium 10% FCS sowie gegen mikrobielle Kontaminationen ein Gemisch aus PenicillinG- Natriumsalz und Streptomycinsulfat zugesetzt, was einer Endkonzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  Streptomycin bzw.  $100 \text{u/ml}$  Penicillin entspricht. Bei einer Dichte von ca.  $10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen geerntet. Mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) wurden die Zellen gewaschen. Die Adhärenz der HaCaT- und der PAM212- Zelllinien wurde mit 2ml Trypsin- EDTA (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 5-10min aufgehoben. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur 5min lang mit  $1000 \text{U/min}$  zentrifugiert. Das Trypsin-EDTA wurde mit einer Pasteurpipette entfernt, die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und für weitere Kultivierung oder Versuche verwendet. Alle Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5% Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) kultiviert.

#### **2.2.2. UV- Bestrahlung**

Es wurden  $2 \times 10^5$  HaCaT- Zellen/ml auf Petrischalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 bis 90% inkubiert. Mindestens 16 Stunden vor der Bestrahlung wurden die Zellen in FCS- freiem Medium kultiviert, da FCS durch Absorption der UV- Strahlen zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen könnte. Kurz vor der Bestrahlung wurden die Zellen mit  $37^\circ\text{C}$  erwärmtem PBS gewaschen und während der Bestrahlung in PBS (siehe Rezept 1) belassen. Für die UV- B- Bestrahlung wurden sechs FS20 UV- Lampen (Philips, Eindhoven, Holland) mit einer Emission im Bereich von 290 bis  $320 \text{nm}$  Wellenlänge verwendet. Direkt nach der UV- Bestrahlung wurde das

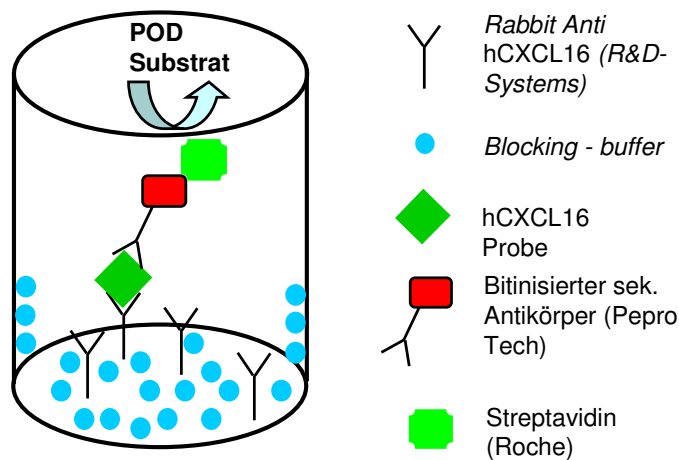
PBS durch serumfreies DMEM- Medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) ersetzt.

### **2.2.3. Versuche zur Freisetzung von CXCL16 bei kultivierten Keratinozyten**

Kultivierte adhärenente Keratinozyten wurden mit frischem serumfreiem DMEM-Medium bzw. RPMI- Medium versorgt und Stimulantien bzw. Inhibitoren zugegeben. Nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Überstände entnommen und in 1,5ml Reaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren. Nach Entnahme des Überstandes wurden die Zellen mit PBS (siehe Rezept 1) gewaschen. Zur Herstellung von Lysaten wurden den Zellen Lysespuffer (siehe Rezept 6) hinzugegeben und mit einem Schaber vom Kulturplattenboden entfernt. Die Lysate wurden in Reaktionsgefäße gegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Hiernach erfolgte die Zentrifugation bei 3000U/min für 5min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment verworfen. Die Zelllysate wurden wie die Zellüberstände bei -20°C gelagert.

### **2.2.4. Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)**

Zum quantitativen Nachweis von humanem bzw. murinem CXCL16 wurde ein *Sandwich Enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) verwendet. Ein derartiger *Sandwich- ELISA* zeichnet sich durch die Verwendung zweier Antikörper gegen das zu detektierende Protein aus, wobei ein Antikörper direkt an der Mikrotiter- Platte haftet und als Fangelement dient, während ein Anderer am Zielmolekül bindet und mittels einer Markierung, in diesem Fall über Biotin, den Nachweis ermöglicht. An diesem Biotin- gekoppelten Antikörper bindet ein Peroxidase- gekoppeltes Streptavidin. Die Peroxidase katalysiert im nächsten Schritt die Umsetzung von BM Blue POD Substrat zu einem farbigen Reaktionsprodukt. Die Reaktion wird nach 10-15min mit 1,8M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion im Photometer gemessen. Anhand eines definierten Standards kann durch eine photometrische Messung die Konzentration des Proteins bestimmt werden.



**Abb.2.3 Schematische Darstellung des hCXCL16 Sandwich ELISA.** Im folgenden Text wird dieser erklärt.

### 2.2.4.1. hCXCL16 Enzyme linked immuno Sorbent assay

Auf einer 96- well Platte (Microlon) der Firma Greiner (Frickenhausen) wurden für 16 Stunden 50µl einer Lösung mit dem Antikörper goat anti- human hCXCL16 der Firma R&D- Systems (Endkonzentration 1µl/ml) in *coating buffer* (siehe Rezept 2) inkubiert. Anschließend wurde durch Wenden der Platte der Antikörper entfernt, dreifach mit *washing buffer* (siehe Rezept 3) ausgewaschen und zusätzlich gründlich ausgeschlagen. Hiernach wurden die Vertiefungen mit 200µl *blocking buffer* (siehe Rezept 4) für zwei Stunden blockiert, anschließend wieder gewaschen und gründlich ausgeschlagen. Jetzt wurden 50µl der Proben in Form von Überständen bzw. Lysaten aus den Zellversuchen in die Vertiefungen pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Um die Konzentration an hCXCL16 bestimmen zu können, wurden zusätzlich 50µl der humanen rekombinanten CXCL16 Chemokindomäne- Standard von R&D Systems 1:2 seriell verdünnt. Beginnend mit 6,25ng/ml wurde diese Verdünnungsreihe jeweils zweifach aufgetragen. Der achte Wert entsprach dem Leerwert. Die Verdünnungsreihe wurde zweifach aufgetragen, um später einen Mittelwert bilden zu können. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Platte wieder gewaschen. Hiernach wurden für weitere zwei Stunden der biotinierte Antikörper Hase-α hCXCL16 von PeproTech (Endkonzentration von 150µg/ml) in *dilution buffer* (siehe Rezept 5) zu-



gegeben und inkubiert. Danach erfolgte wieder das Waschen und Ausklopfen der Platten. Jetzt wurden 50µl Streptavidin- peroxidase (POD) von Roche Diagnostics (Endkonzentration 500U/ml in *dilution buffer*) zugegeben, eine Stunde inkubiert, danach viermal gewaschen und schließlich 80µl POD- Substrat (BM blue, Roche Diagnostics) in die *Wells* pipettiert und erneut für ca. 15min inkubiert. Sobald ein deutlicher Farbumschlag wahrzunehmen war, wurde die Reaktion mit 100µl 1,8M Schwefelsäure gestoppt. Für die Auswertung wurde die Extinktion in einem 96- *well* Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450\text{nm}$  und einem Referenzfilter von  $\lambda = 690\text{nm}$  gemessen und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) dargestellt.

### **2.2.4.2. mCXCL16 Enzyme linked immuno Sorbent assay**

Zur Untersuchung muriner Überstände und Lysate im ELISA wurde ein kommerzieller „ELISA DuoSet mouse CXCL16“, Katalognummer DY503, von R&D Systems verwendet. Es wurde exakt nach den Angaben des Herstellers gearbeitet, wobei auch in diesem Fall eine 96- *well* Platte genutzt wurde. Vom Prinzip her wurde beim mCXCL16 ELISA genau nach dem gleichen Schema wie beim hCXCL16 ELISA gearbeitet. Auch in diesem ELISA wurde zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge eine Standardreihe in Doppelwerten in die Vertiefungen der ELISA- Mikrotiterplatte pipettiert. Hiefür wurde mCXCL16- Protein in einer seriellen Verdünnung, beginnend mit 1µg/ml bis 0,015 µg/ml, zugeführt. Dies ergab sieben Versuchsansätze für die Standardreihe. Als Leerwert wurde eine Probe ohne mCXCL16 verwendet

### **2.2.4.3. Auswertung der Mikrotiterplattenphotometer- Daten**

Nach Bestimmung der Extinktionswerte im Photometer wurden die Werte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXEL (Microsoft) ausgewertet. Zuerst wurden die Messwerte für den seriell verdünnten Standard gemittelt und die Geradengleichung für die Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Verdünnung des Standards bestimmt. Mit dieser Gleichung konnte die CXCL16- Konzentration der Proben errechnet werden.

Bei allen ELISA- Experimenten wurden mit mindestens doppeltem Versuchsansatz gearbeitet, aus denen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariablen um ihren Mittelwert. Sie

wurden ebenfalls mit EXCEL (Microsoft) errechnet und in den Diagrammen angegeben.

Die Abbildungen 3.3, 3.7 – 3.15, 3.18 und 3.19 stehen exemplarisch für mindestens drei Experimente unter gleichen Bedingungen.

### **2.2.5. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- Page)**

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- Page) durchgeführt. Zunächst wurde ein Trenngel hergestellt (siehe Rezept 7).

Die Trenngellösung wurde zwischen zwei Glasplatten (Mini- Protean- 3- System, BioRad) mit einem Abstand von 0,75mm gebracht und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel hergestellt (siehe Rezept 8). Die Taschen wurden mit Hilfe eines Kamms in das Gel eingebracht.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit einem reduzierenden 2x SDS- Probenpuffer (siehe Rezept 9) versetzt und für 10min auf 95°C erhitzt.

Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde es in einer mit SDS-Elektrodenpuffer (siehe Rezept 10) gefüllten Vertikalgelelektrophoresekammer eingebracht und die aufgekochten Proteinproben sowie der Proteinstandard Prestained Molecular Weight Marker (SM0441) (Fermentas) aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 150V durchgeführt. Kurz vor dem Auslaufen des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblau wurde die Elektrophorese beendet.

### **2.2.6. Western Blot**

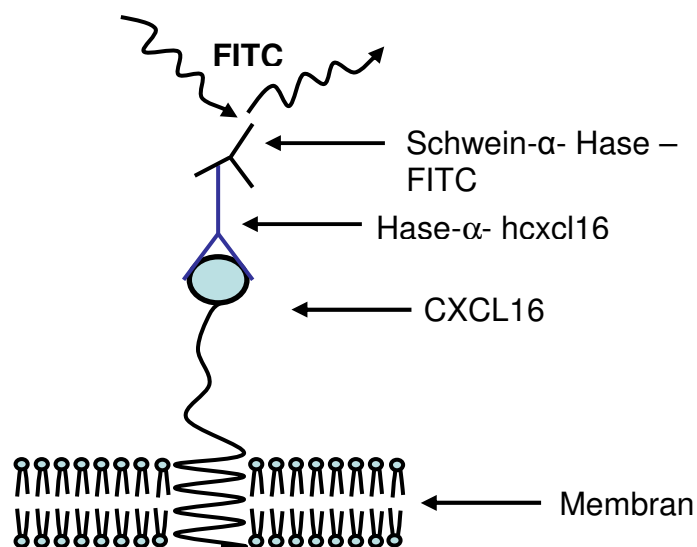
Der *Western Blot* dient als Nachweis von immunreaktiven Proteinen, der durch den Transfer von einem Polyacrylamidgel auf eine proteinbindende Membran stattfindet. Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers wurde eine Mini Trans- Blot Transferzelle (wet- blot) von BIO- RAD genutzt.

Für den Transfer wurde eine PVDF- Membran (Hybond- P, Amersham, Little Chalfont, UK) für das Gel zugeschnitten und in Methanol aktiviert, danach in Aqua dest. gewaschen und in *Western Blot*- Transferpuffer (siehe Rezept 11) äquilibriert. Das Gel und acht für die Membran zugeschnittene Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Nach der Aktivierung wurden diese in folgender Reihenfolge

eingespannt: vier Filterpapiere - die PVDF- Membran - das Gel und 4 weitere Filterpapiere.

Der Transfer erfolgte 80min lang bei einer konstanten Spannung von 20V. Folgend wurde die Membran mit PBS- T für 10min gewaschen um Reste des Gels auf der Membran zu entfernen. Hiernach wurde sie für länger als zwei Stunden mit 10ml *Western Blot*-Blockierpuffer (siehe Rezept 12) bei 4°C blockiert und wieder mit PBS- T gewaschen. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal mit 10ml Waschpuffer 15min lang gewaschen. Hiernach wurde ein POD- konjugierter Sekundärantikörper auf der Membran für eine weitere Stunde inkubiert und diese anschließend dreifach gewaschen, wodurch die nicht spezifisch gebundenen Sekundärreagenzien von ihr entfernt wurden. Die Visualisierung der immunologisch detektierten Proteine erfolgte mit Hilfe des *ECL Plus Western Blotting Detection System* nach Angaben des Herstellers. Detektiert wurde mit einer Chemilumineszenzkamera der Firma Kodak mit Expositionszeiten zwischen 5min und 20min.

### 2.2.7. Durchflusszytometrie



**Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Nachweis von hCXCL16 mittels Durchflusszytometrie.**

Pro Versuchsansatz wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 1,5ml Reaktionsgefäße gebracht. Um eine weitere Veränderung der Oberflächenexpression zu vermeiden, erfolgte zunächst die Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei 4°C (1000U/min für 5min). Da-

nach wurden die Zellen in 100µl eiskaltem FACS- Puffer (siehe Rezept 13) aufgenommen, der bereits den jeweiligen Primärantikörper enthielt. Als Primärantikörper gegen das humane CXCL16 diente Hase- $\alpha$ - hCXCL16 (500 P 200) von PeproTech (London, UK) in einer Konzentration von 1µg/ml. Gegen das murine CXCL16 kam Ratte- $\alpha$ - mCXCL16 von R&D- Systems (Wiesbaden) in gleicher Konzentration zur Anwendung. Für den Nachweis der Oberflächenexpression von CXCR6 auf Bonzo- HEK293- Zellen wurde als Primärantikörper Maus- $\alpha$ - hCXCR6 (MAB 699) von R&D- Systems in einer Konzentration von 1,25µg/ml eingesetzt. Die Primärantikörper wurden für 1 Stunde auf einem Schüttler auf Eis inkubiert. Um ungebundene Primärantikörper nach der Inkubation zu entfernen, wurde 1ml FACS- Puffer hinzugegeben, die Zellsuspension mit ca. 100µl steril filtriertem FCS unterschichtet (jeweils vorgekühlt auf 4°C), dieses in einer 4°C- temperierten Zentrifuge zentrifugiert (1000U/min für 5min) und der Überstand vorsichtig verworfen. Im nächsten Schritt wurde für das mCXCL16 ein Phycoerythrin- (PE) gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Dieser Ziege- $\alpha$ - Ratte- Sekundärantikörper (113-116-071) (Jackson Immuno Research) wurde im Verhältnis 1:75 in FACS- Puffer verdünnt. Pro Versuchsansatz wurden erneut 100µl Antikörperlösung eingesetzt. Der sekundäre Antikörper für die Oberflächenexpression von hCXCL16 war ein polyklonaler Antikörper vom Schwein gegen Kaninchen- Immunglobin, gekoppelt an FITC (Fluorescein- Isothiocyanat) (F 0054) der Firma Dako A/S (Dänemark), der im Verhältnis von 1:50 in FACS- Puffer verdünnt eingesetzt wurde. Der sekundäre Antikörper für die CXCR6- Oberflächenexpression war ein polyklonaler Antikörper von der Ziege- gegen Ratten- Immunglobin, der PE gekoppelt war. Die Inkubationszeit aller sekundären Antikörper betrug eine Stunde. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Phycoerythrin und Fluorescein- Isothiocyanat wurden die Ansätze vor Licht geschützt. FITC besitzt ein Absorptionsmaximum von 495nm und ein Emissionsmaximum von 519nm. Für PE sind diese 480nm und 575 nm. Nach der Inkubation wurde erneut das Volumen mit 1ml FACS- Puffer vergrößert und die Zellsuspension mit FCS unterschichtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (1000U/min für 5min) und der Überstand vorsichtig verworfen. Zuletzt wurden die Zellen in 400µl FACS- Puffer für die Messung resuspendiert. Sollte die Messung nicht sofort erfolgen, wurden die Zellen alternativ in 200µl FACS- Puffer resuspendiert und anschließend mit 200µl Fixierlösung (siehe Rezept 14) fixiert. Die durchflusszytometrische

Messung erfolgte jedoch stets innerhalb von 24h. Die Proben wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Abbildungen 3.4, 3.5, 3.17 und 3.20 stehen exemplarisch für mindestens drei Experimente unter den gleichen Bedingungen.

### **2.2.8. RNA- Isolierung, Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Um die Expression des hCXCL16 in HaCaT- Zellen nachzuweisen, wurde deren Gesamt- RNA isoliert. Dazu wurden 5 bis  $10 \times 10^6$  Zellen geerntet und in 1ml TRIzol der Firma Invitrogen in ein Reaktionsgefäß aufgenommen und gut vermischt. TRIzol, ein Gemisch aus Phenol und Guanidin- Isothiocyanat, zerstört die Membran der Zellen und setzt somit die RNA und DNA frei. Nach einer Inkubationszeit von 5min bis 10min wurden 200µl Chloroform zugeben, gut gemischt und nach einer kurzen Inkubationszeit von 2min bis 3min das Gemenge aus Zellresten, TRIzol und Chloroform für 15min bei Raumtemperatur mit 13000U/min zentrifugiert. Hierdurch entstanden drei Phasen, von denen die obere für die weiteren Versuche genutzt wurde. Diese hatte ein Volumen von ca. 600µl, zu dem 600µl 2- Propanol hinzugegeben und nach gutem Durchmischen für ca. 10min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde erneut für 15min bei Raumtemperatur mit 13000U/min zentrifugiert, der Überstand gründlich abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen und für 5min bei Raumtemperatur mit 13000U/min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Sediment ca. 10min lang luftgetrocknet, hiernach in 30µl DEPC- Wasser (siehe Rezept 15) resuspendiert und 10min lang bei 60°C erhitzt. Jetzt wurden die RNA- Konzentration sowie der Reinheitsgrad dieser Probe gemessen. Jeweils 5µg Gesamtnukleinsäure wurden für den DNA- Verdau genutzt.

#### **DNA- Verdau:**

**5µg Gesamtnukleinsäure**  
**10µl 10xPuffer mit MgCL<sub>2</sub>**  
**1U DNase I**

Der Verdau wurde für 30min bei 37°C durchgeführt. Zur Abstopfung wurden 10µl 25mM EDTA zugegeben und für 10min bei 65°C inkubiert. Auf diese Art wurde das

Enzym inaktiviert, ohne RNase- Aktivität zuzulassen. Nun wurde das Gemenge precipitiert um die Salze und die DNase herauszufiltern.

### **Precipitation:**

**Probe**  
**1µl Glykogen**  
**20µl 3M Natrium Acetat, pH 5,2**  
**400µl Ethanol**

Dieser Mix wurde für 5min in flüssigen Stickstoff geben und die wieder aufgetaute Probe bei 13000U/min und 4°C für 20min zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde erneut mit 750µl 70%igem Ethanol gewaschen und unter gleichen Bedingungen für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde erneut für 10min luftgetrocknet und in 25µl DEPC- Wasser aufgenommen.

Für die reverse Transkription wurden je 1µg isoliertes Gesamt- RNA eingesetzt.

### **Reverse Transkription:**

**1µg Gesamt-RNA**  
**1µl dNTP mix (10mM Stock)**  
**7µl DEPC-Wasser**  
**→ 5min bei 65°C Inkubation, danach auf Eis legen**

**Zum Mix dazu:**  
**4µl 5x First-stand Buffer**  
**2µl 0,1M DTT**  
**→ 2min bei 42°C Inkubation**

**Zum Mix dazu:**  
**1µl Superscript (200u/µl)**

Zusammen ergab dieses einen 20µl großen reversen Transkriptionsansatz, der zunächst für 50min bei 42°C und danach für weitere 15min bei 70°C inkubiert.

Direkt im Anschluss wurde die Amplifikation der DNA durchgeführt. Hierzu wurden 50µl Ansätze gewählt. Es wurden die benötigten Reagenzien auf Eis pipettiert und mit Hilfe von Taq- Polymerase amplifiziert.

### Polymerasekettenreaktion:

**37,25µl Wasser**  
**1µl DNA**  
**5µl 10x Reaktionspuffer**  
**0,5µl dNTP-Mix**  
**1,5 mM MgCl<sub>2</sub>**  
**0,5µl 0,2µM Forward Primer**  
**0,5µl 0,2µM Reverse Primer**

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

### PCR- Programm:

**120sek bei 95°C (Denaturierung)**

30x 

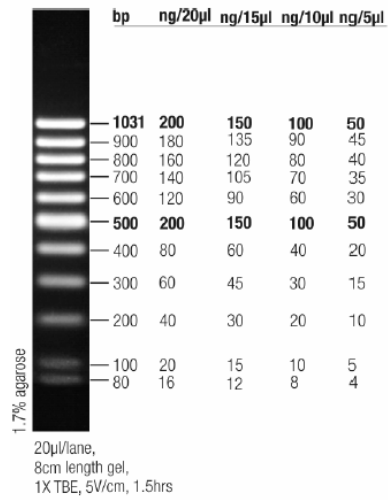
<b>30sek bei 95°C (Denaturierung)</b>
<b>30sek bei 60°C (Primer-Anlagerung)</b>
<b>30sek bei 72°C (Elongation)</b>

**600sek bei 72°C (Elongation)**  
**∞ bei 4°C (über Nacht)**

### 2.2.9. Polyacrylamid- Gelelektrophorese für DNA/RNA

Zur Auftrennung der PCR- Produkte wurden 7%ige Polyarylamid- Gelee (siehe Rezept 16) zwischen zwei Glasplatten (Mini- Protean- 3- System, BioRad) mit einem Abstand von 1,5mm gegossen. Die Taschen wurden mit Hilfe eines Kammes (10 Taschen) in das Gel eingebracht. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine mit TAE- Puffer gefüllte Vertikalgelelektrophoresekammer gestellt und die PCR- Produkte sowie ein Low- Range- Marker der Firma Fermentas (St. Leon- Rot) aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 100V für ca. 1Std. durchgeführt.

Die Abbildungen 3.2, 3.21 und 3.23 stehen exemplarisch für mindestens drei Experimente unter gleichen Bedingungen.



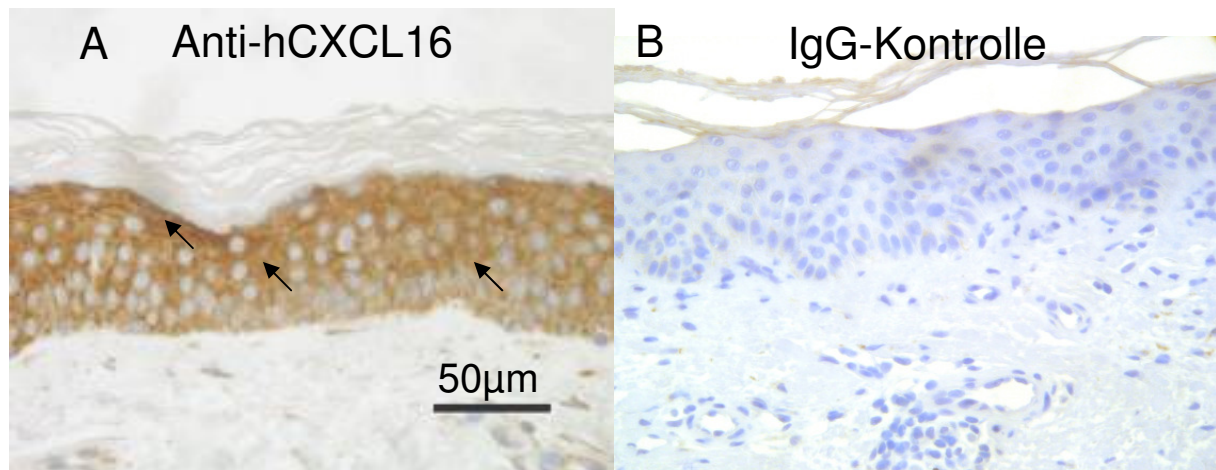
**Abb. 2.5 DNA-Leiter, „Low Range“ (SM0383, Fermentas (St. Leon-Rot))**  
1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp



## 3. Ergebnisse

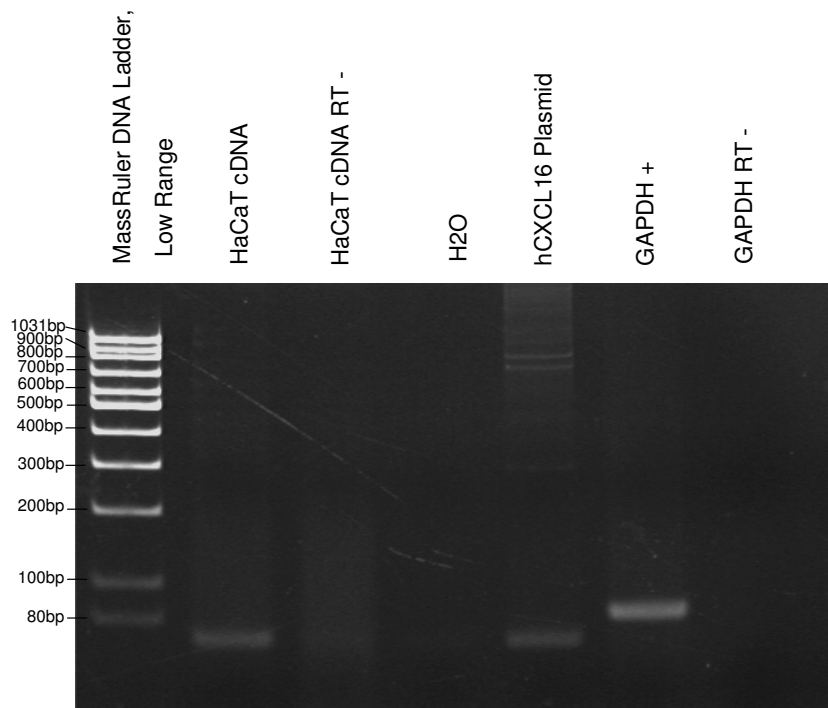
### 3.1. Expression von CXCL16 in der Haut

In einer ersten Analyse zum Vorkommen von CXCL16 in gesunder menschlicher Haut wurde eine immunhistologische Untersuchung, in Kooperation mit Dr. rer. nat. Felix Scholz, Dermatologie, Kiel, durchgeführt. Hierbei diente ein polyklonaler Antikörper, der gegen die Chemokindomäne des humanen CXCL16 (hCXCL16) gerichtet war. Es konnte gezeigt werden, dass CXCL16 von humanen Keratinozyten exprimiert wird. Die Immunreaktivität erstreckt sich über die gesamte Epidermis, mit Ausnahme des *Stratum corneum*s (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1 Nachweis von hCXCL16 in gesunder Haut.** Kryoschnitte humaner Haut wurden mit Aceton fixiert, mit 1%igen BSA- haltigen TBS und 0,3%  $H_2O_2$  behandelt und mit einem Kaninchen- anti-hCXCL16- Antikörper (PeProTech) (A) oder einem IgG- Isotypkontrollantikörper (B) über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem Biotin- gekoppelten Sekundärantikörper, gefolgt von einem Avidin-peroxidase-Konjugat und einem chromogenen Reagens (Immunotec Beckmann- Coulter) detektiert. Der Zellkern wurde mit Hilfe des Hemalaun- Reagens gefärbt. A In der normalen gesunden Haut findet sich hCXCL16 vom Str. basale bis zum Str. granulosum. Die Pfeile kennzeichnen die hCXCL16 – Färbung. B IgG – Kontrolle normaler gesunder Haut.

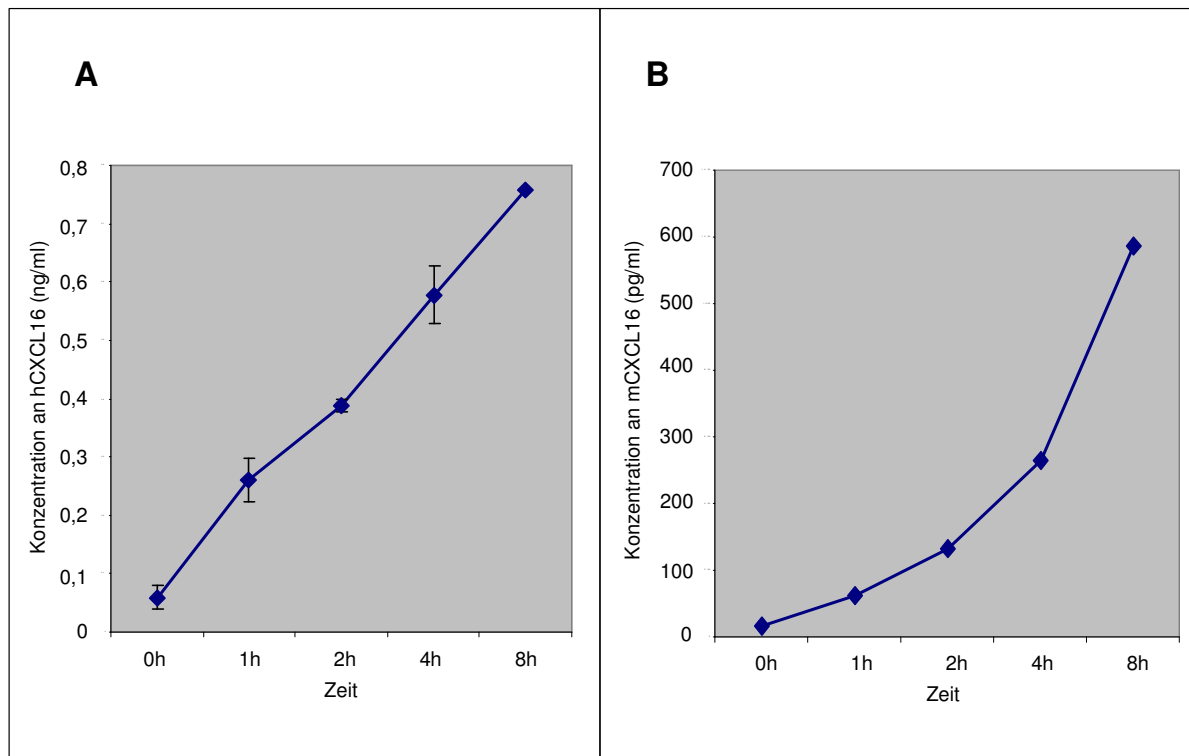
Nachdem die Expression von CXCL16 mit Hilfe der Immunhistochemie auf Keratinozyten der menschlichen Haut gezeigt worden war, stellte sich die Frage, ob auch Keratinozytenzelllinien das Chemokin konstitutiv exprimieren. Hierfür wurden zwei Zelllinien gewählt, die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT und die murine Keratinozytenzelllinie PAM212. Mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) PCR, bei der zunächst die Gesamt- RNA der Zellen isoliert und dann die mRNA in cDNA umgeschrieben wird, wurde die Expression von hCXCL16 untersucht. Abb. 3.2 zeigt ein deutliches Signal für hCXCL16 in den HaCaT- Zellen bei der erwarteten Größe von 75bp.



**Abb. 3.2: Nachweis der hCXCL16- mRNA- Expression mittels RT- PCR.** Zunächst wurde mRNA aus HaCaT- Zellen isoliert und in cDNA revers transkribiert. Anschließend wurden PCRs mit spezifischen Primern für hCXCL16 sowie für GAPDH durchgeführt und die PCR- Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die spezifischen Oligonukleotide wurden so entworfen, dass die amplifizierten Fragmente 75bp für CXCL16 und für GAPDH betragen sollten. Zur Kontrolle wurden PCR-Ansätze mit RNA ohne reverse Transkription (RT-) sowie nur mit Wasser (H<sub>2</sub>O), bzw. mit hCXCL16 cDNA in pcDNA 3.1(+) ebenfalls getestet. In der ersten Spur wurde ein DNA- Marker aufgetragen. Die Größen der einzelnen Fragmente sind in Basenpaaren links von der Abbildung angegeben.

Weiterhin sollte die zeitabhängige konstitutive Expression von humanem und murinem CXCL16 in den jeweiligen Zelllinien mittels ELISA geprüft werden. Für jeden Versuchsansatz wurden  $2 \times 10^5$  Keratinozyten verwendet. Hierbei zeigte sich in den entnommenen Kulturüberständen ein stetiger Anstieg von humanem beziehungsweise murinem CXCL16. In beiden Zelllinien stieg die CXCL16- Konzentration von einem niedrigen Hintergrundwert ausgehend schnell an. In den HaCaT- Zellen war die Zunahme über einen Zeitraum von 8 Stunden nahezu linear und erreichte eine Konzentration von 0,76ng/ml (Abb. 3.3 A). In den Kulturüberständen der PAM212- Zellen wurde eine zunächst langsamere Konzentrationszunahme erkennbar, die sich dann aber nach 4 Stunden deutlich steigerte und schließlich zu einer im Vergleich zu den HaCaT- Zellen höheren Gesamtkonzentration von 1,170ng/ml (1170,8pg/ml) nach 8 Stunden führte (Abb. 3.3 B). Gleichzeitig war in beiden Zelllinien ein Anstieg

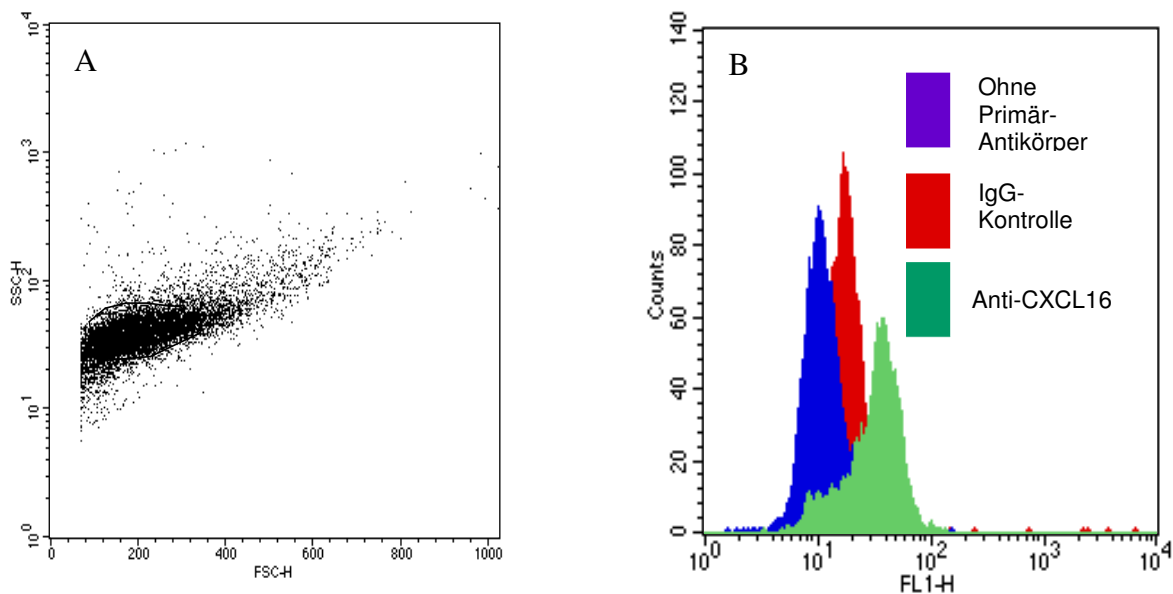
von CXCL16 in den Lysaten nachweisbar. Innerhalb von 8 Stunden stieg die hCXCL16- Konzentration von 0,15ng/ml auf 0,41ng/ml. Die Konzentration an mCXCL16 stieg von 0,545ng/ml (545pg/ml) auf 1,019ng/ml (1019pg/ml) (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.3: Nachweis des konstitutiven *Sheddings* von hCXCL16 (A) und mCXCL16 (B) in HaCaT-Zellen und PAM212 mittels ELISA.**

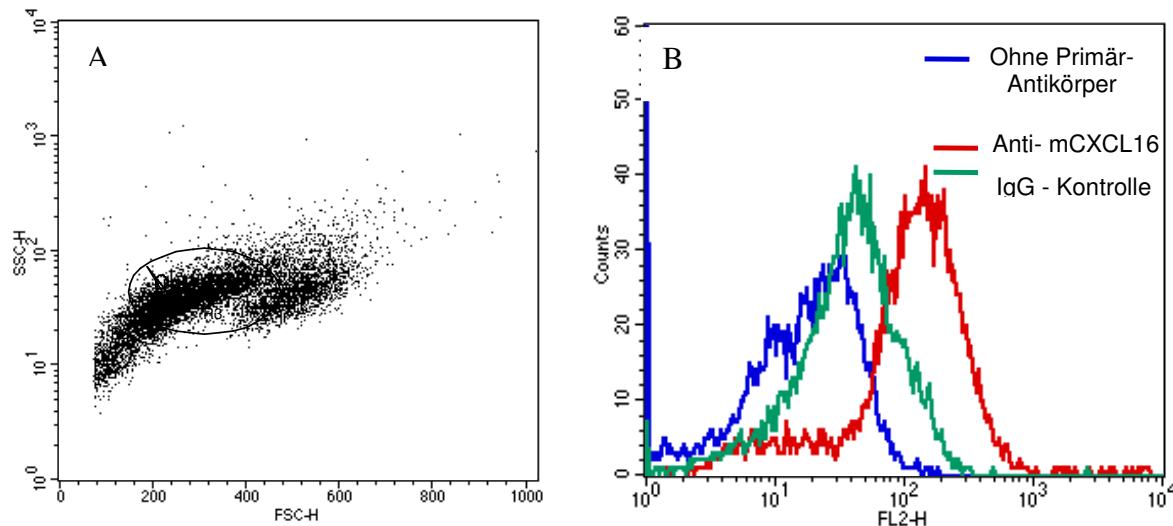
Nach dem Nachweis der mRNA- Expression des hCXCL16 und dem Nachweis der konstitutiven Abgabe des hCXCL16 in den Kulturüberstand sollte die Expression des Proteins auf der Zelloberfläche von HaCaT- Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft werden. Wie in Abb. 3.4B erkennbar, exprimieren HaCaT- Zellen CXCL16 auf ihrer Oberfläche, was durch den erhöhten Fluoreszenz- Wert (MF= 33,68) nach Inkubation mit einem CXCL16- spezifischen Antikörper im Vergleich zur Isotypkontrolle (MF= 16,85) bzw. zur Färbung mit dem Sekundär- Antikörper allein (MF= 10,46) deutlich wird. An dieser Stelle ist anzumerken, dass im Verlauf der Arbeit in unserem Labor von Dipl.Biochemikerin Salvinia Mletzko in Zusammenarbeit mit Dr.rer.nat Alexander Schulte ein weitaus sensitiverer monoklonaler CXCL16-Antikör-

per mit Hilfe der Hybridomtechnik gewonnen wurden war, der in weiteren Versuchen der Arbeit zum Einsatz kam.



**Abb. 3.4 Nachweis des hCXCL16 auf der Oberfläche von HaCaT- Zellen.** HaCaT- Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen hCXCL16 (grün), einer Isotypkontrolle (rot) oder ohne primären Antikörper (blau) inkubiert, danach mit Fluoreszeini- Isothiocyanat- gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Abbildung **A** zeigt eine Darstellung der Zellen im Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht in einem *dot- plot*. Für die CXCL16-Messung wurden nur die Zellen im „Gate“ (schwarze Umrandung) betrachtet. Abbildung **B** zeigt die Fluoreszenzverteilung auf den Zellen nach CXCL16- Oberflächenmarkierung. Dargestellt ist die Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb der gemessenen Zellpopulation (Abszisse: relative Fluoreszenz, Ordinate: Anzahl der Zellen dieser Fluoreszenzstärke). Zusätzlich wurde aus dem Histogramm die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet.

Ebenfalls wurde die Oberflächenexpression von mCXCL16 auf PAM212- Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich prinzipiell das gleiche Bild wie bei den HaCaT- Zellen. Die geringste Fluoreszenz zeigten die unbehandelten Zellen (blau) (MF= 18,11), gefolgt von der Isotypkontrolle (grün) (MF= 38,54) und der höchsten Fluoreszenz auf den Zellen, die mit dem primären und dem sekundären Antikörper behandelt worden waren (MF= 121,88) (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5 Nachweis von mCXCL16 auf der Oberfläche von PAM212- Zellen.** PAM212- Zellen wurden mit einem gegen mCXCL16 gerichteten monoklonalen Antikörper inkubiert. Zellgebundene Antikörper wurden darauf folgend mit einem PE- gekoppelten Sekundärantikörper und anschließender Durchflusszytometrie detektiert. Abbildung **A** zeigt eine Darstellung der Zellen im Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht. Abbildung **B** zeigt die Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb der gemessenen Zellpopulation. Zusätzlich wurde die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet.

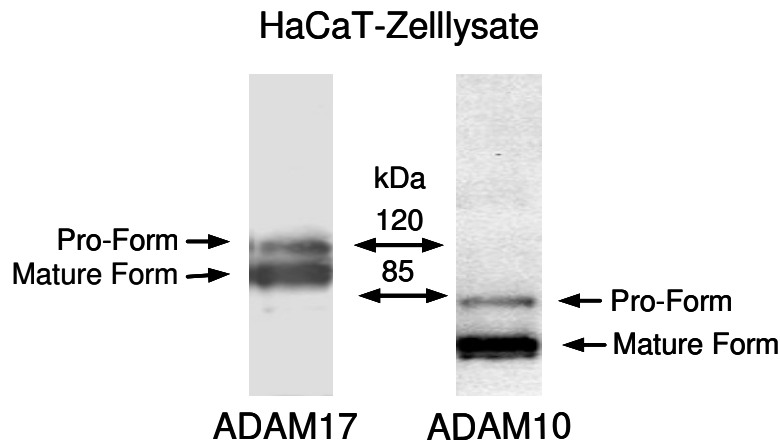
Diese ersten Daten zeigen, dass CXCL16 in murinen und humanen Keratinozyten konstitutiv gebildet und CXCL16 in den Zellüberstand abgegeben wird. Dieses könnte ein Hinweis auf eine endogene konstitutive Freisetzung von CXCL16 in der Haut sein.

### 3.2. Das CXCL16- *Shedding* ist durch Metalloproteinaseninhibitoren inhibierbar

Nachdem festgestellt worden war, dass CXCL16 in HaCaT- Zellen und auch in PAM212- Zellen konstitutiv exprimiert wird, stellte sich die Frage, wie und ob CXCL16 auf ihrer Zelloberfläche proteolytisch gespalten wird. Hierfür wurden verschiedene Metalloproteinaseninhibitoren verwendet. Marimastat ist ein Breitbandinhibitor, der ADAM10 als auch ADAM17 sowie weitere Metalloproteasen hemmt. Ebenfalls wurden die spezifischen Metalloproteinaseninhibitoren GI254023X und GW280264X eingesetzt. Durch GW280264X werden sowohl ADAM10 und ADAM17 gehemmt [35; 78-80], während GI254023X nur ADAM10 inhibiert [35; 78-81].

Um nachzuweisen, dass die beiden Proteasen ADAM17 und ADAM10 *in vitro* in Keratinozyten exprimiert werden, wurden *Western Blot* Analysen mit Lysaten von HaCaT- Zellen durchgeführt. Das Resultat waren je zwei Banden, welche die inaktive Form, auch als Proform bezeichnet, und die aktive, mature Form darstellen. Für ADAM10 wurde eine der Proform entsprechende Bande bei etwa 85kDa und eine

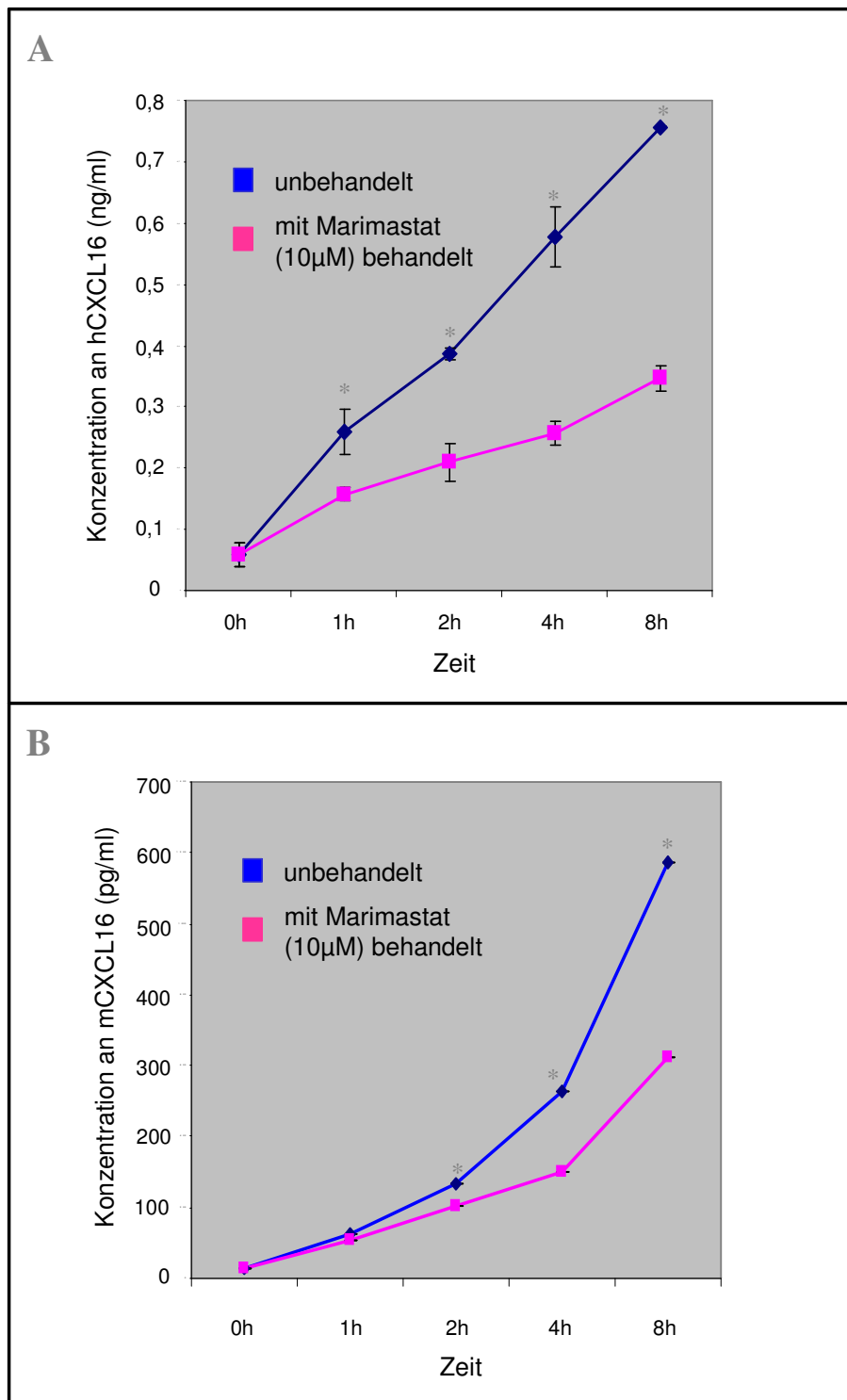
Bande bei etwa 64kDa sichtbar, welche der murenen Form entspricht [36]. Für ADAM17 ließ sich ebenfalls eine Proform bei 120kDa und eine murene Form mit 95kDa nachweisen [68].



**Abb. 3.6: Western Blot Nachweis von ADAM10 und ADAM17 in HaCaT- Zellen.** Die Zellysate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran übertragen. Diese wurde mit Antikörpern gegen ADAM17 (links) bzw. ADAM10 (rechts) inkubiert. Die auf der Membran gebundenen Primärantikörper wurden mit einem POD- gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

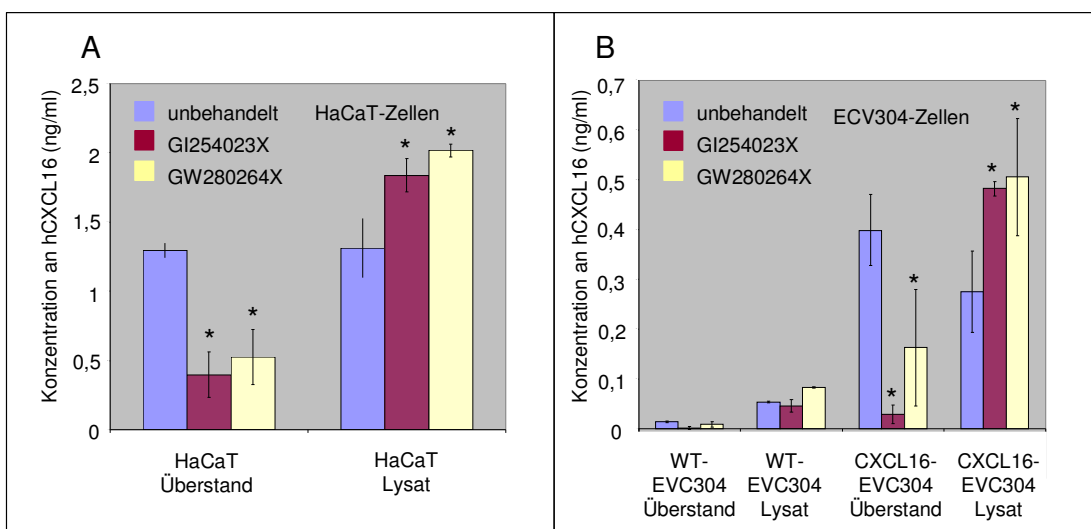
Es sollte nun durch ELISA-Tests ermittelt werden, ob die Abgabe von hCXCL16 in HaCaT-Zellen durch Metalloproteinasen vermittelt wird. Hierfür wurde zunächst der Breitbandinhibitor Marimastat in einer Konzentration von 10 $\mu$ M verwendet. Die Versuche ergaben, dass die Zugabe von Marimastat zu einer deutlichen Reduzierung von löslichem hCXCL16 im Kulturüberstand führte. Schon nach einer Stunde war eine Abnahme wahrzunehmen, die sich bei längeren Inkubationszeiten in Gegenwart des Inhibitors verstärkte (Abb. 3.7 A).

Um heraus zu finden, ob die Zugabe von Marimastat in den murinen Keratinozyten den gleichen Effekt hervorruft, wurde der gleiche Versuchsansatz in einem Zellkulturversuch mit PAM212- Zellen durchgeführt. Es ergab sich der gleiche Effekt wie bei den HaCaT- Zellen. Auffällig ist in diesem Fall, dass die Inhibition des mCXCL16- *Sheddings* erst nach 4 Stunden deutlich zu erkennen war. Weiterhin ist zu bemerken, dass das zellassoziierte CXCL16 in HaCaT- sowie in PAM212- Zellen zunahm (Daten werden nicht gezeigt). Somit konnte eine Beteiligung der ADAMs für das *Shedding* von CXCL16 in Hautzellen bewiesen werden (Abb. 3.7 B).



**Abb. 3.7 Inhibition des *Shedding* von hCXCL16 in HaCaT- Zellen (A) und mCXCL16 in PAM212- Zellen (B) durch den Breitbandinhibitor Marimastat.** HaCaT- Zellen und PAM212- Zellen wurden in frischem Medium (700µl) unterschiedlich lange mit oder ohne Zusatz von Marimastat (10µM) inkubiert. Die anschließende Konzentrationsmessung von löslichem hCXCL16 (A) und mCXCL16 (B) im Kulturmedium erfolgte durch ELISA. Die \* entsprechen jeweils einer Signifikanz  $p < 0,05$  zwischen den inhibierten und den unbehandelten Zellen.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, welche Proteasen für die Inhibition des hCXCL16 in HaCaT verantwortlich sind. Da bereits bekannt ist, dass die ECV-304-Zelllinie hCXCL16 endogen freisetzt und die konstitutive Freisetzung durch die Metalloproteinaseninhibitoren GI254023X und GW280264X inhibiert wird, wurde diese Zelllinie als Kontrolle verwendet [36]. Die ECV- Zelle wurde früher als endotheliale Zelllinie beschrieben [82], was später revidiert werden musste. Es handelt sich hierbei um eine Blasenkarzinomzelllinie [83]. In diesem Versuch wurden WildTyp- ECV-Zellen, CXCL16- transfizierte ECV- Zellen und HaCaT- Zellen verwendet. Es zeigte sich, dass die Konzentration an hCXCL16 in den HaCaT- Zellen deutlich höher war als in ECV- Zellen, selbst wenn letztere transfiziert waren. Weiterhin konnte in diesem Versuch das Ergebnis in der von Abel et al. beschriebenen Arbeit reproduziert werden: Inhibiert man ADAM10 mit dem spezifischen ADAM10- Inhibitor GI254023X, ist eine deutliche Reduktion an löslichem hCXCL16 im Überstand erkennbar (Abb. 3.8). Gleichzeitig erhöht sich die Konzentration an hCXCL16 in den Lysaten (Daten werden nicht gezeigt). Ebenfalls konnte keine weitere Inhibition durch GW280264X, der ADAM10 sowie ADAM17 hemmt, nachgewiesen werden. Dieses waren Hinweise auf die Beteiligung von ADAM10, jedoch nicht von ADAM17 an der konstitutiven Freisetzung des hCXCL16 in HaCaT-Zellen.

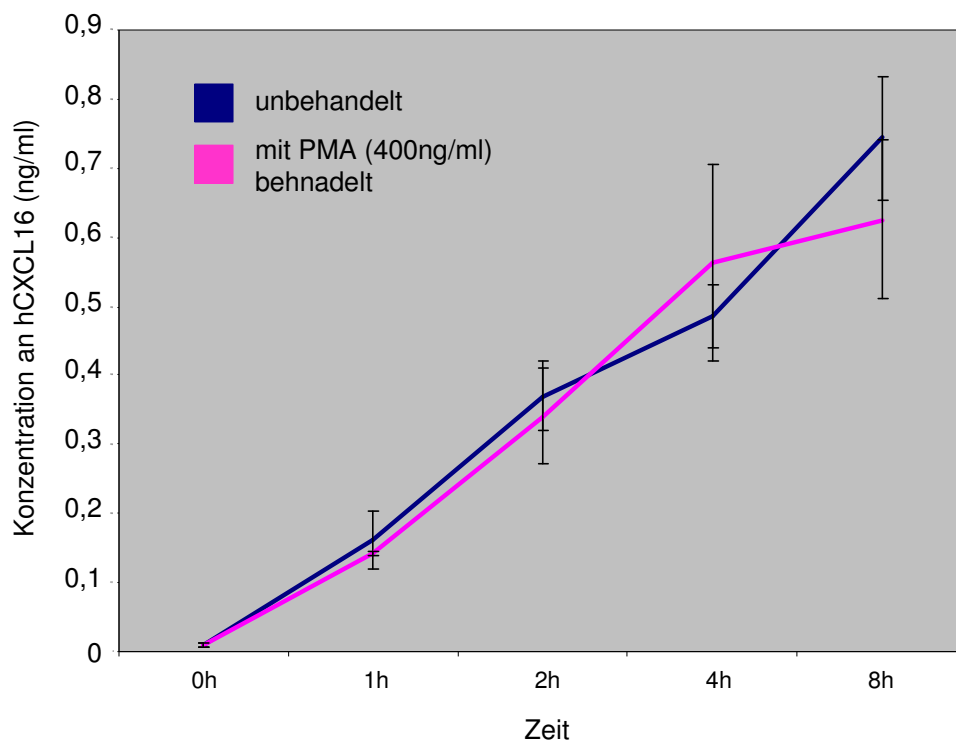


**Abb. 3.8 Inhibition des *Shedding* von hCXCL16 auf HaCaT- Zellen durch die Metalloproteinaseninhibitoren GI254023X und GW280264X.** HaCaT- Zellen wurden für 4Std. mit bzw. ohne die Metalloproteinaseninhibitoren GI254023X und GW280264X in einer Konzentration von 10µM inkubiert und anschließend die Konzentration des freigesetzten CXCL16 durch einen ELISA bestimmt. Die \* entsprechen einer Signifikanz  $p < 0,05$  zwischen den inhibierten Zellen und den unbehandelten Zellen.



Um diese These zu stärken, wurde in einem zeitlichen Verlauf der Effekt des PKC-Antagonisten PMA in HaCaT- Zellen geprüft. PMA führt in diversen Zelllinien zu einer rapiden Hochregulation von *Shedding*, welche überwiegend von ADAM17 reguliert wird [84-85]. Dieses konnte bisher in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, wie zum Beispiel in der U343- Astrozytenzelllinie, der A761- Astrozytenzelllinie sowie in der CXCL16- transfizierten COS-7- Zelllinie [36; 43].

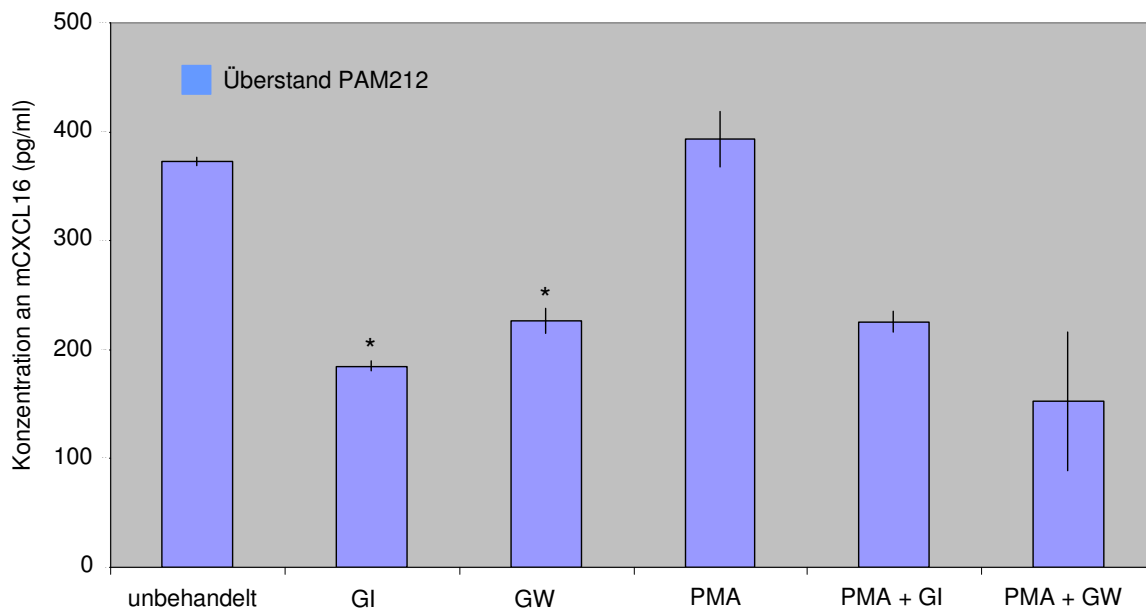
Für die HaCaT- Zelllinie konnte dieser PMA- Effekt allerdings nicht bestätigt werden. Es zeigte sich, dass in diesem Fall PMA keinen Einfluss auf die Freisetzung von hCXCL16 hat (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9 Einfluss vom PMA auf das *Shedding* von CXCL16 auf HaCaT- Zellen.** PMA wurde in einer Konzentration von 400ng/ml zu HaCaT- Zellen gegeben. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Konzentrationen des freigesetzten hCXCL16 im ELISA gemessen.

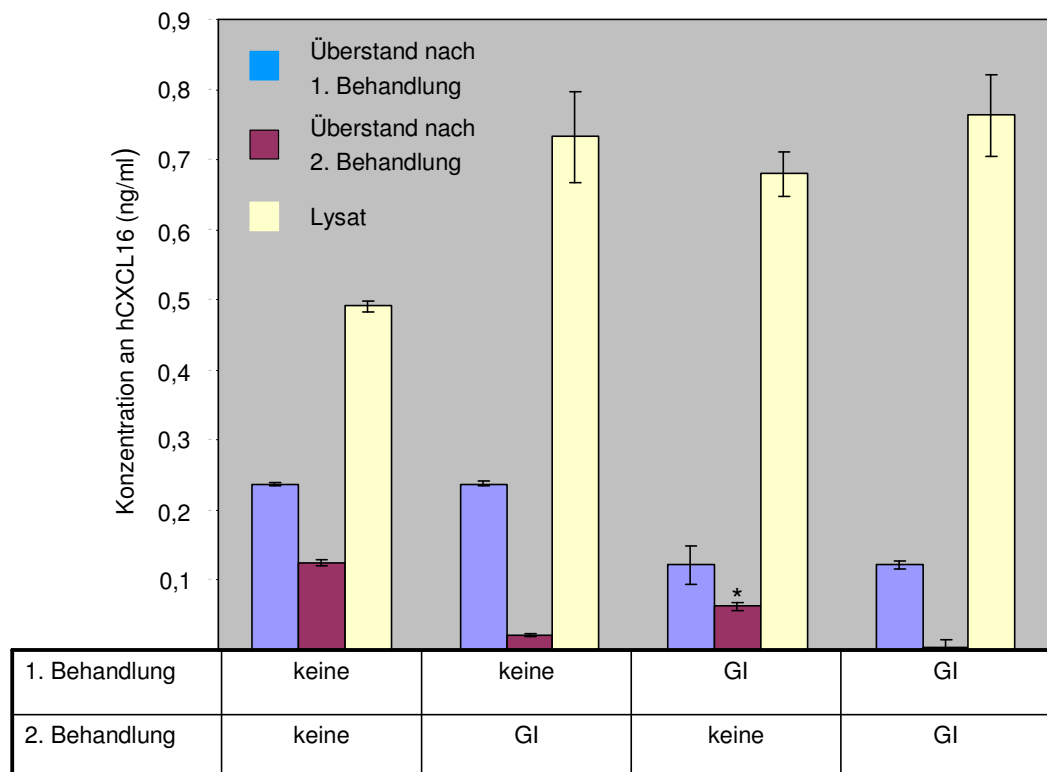
Um diese Hypothese zu stärken, wurden mit der murinen PAM212- Zelllinie die gleichen Zellkulturversuche durchgeführt. Auch hier konnten GI254023X und GW280264X in fast gleichem Maß die konstitutive Freisetzung an mCXCL16 reduzieren (Abb. 3.11). PMA hatte wie bei den HaCaT- Zellen keinen Einfluss auf die Freisetzung von mCXCL16 (Abb. 3.10). Auch eine fünfminütige Vorinkubation der Inhibitoren GI254023X und GW280264X erzielte keinen Effekt nach der Zugabe von

PMA (Abb. 3.10). Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass ADAM10, jedoch nicht ADAM17 an der konstitutiven Freisetzung von CXCL16 beteiligt ist.



**Abb. 3.10 Einfluss von PMA und der Metalloproteinase- Inhibitoren GI254023X und GW280264X auf das *Shedding* von mCXCL16 in PAM212- Zellen.** PAM212- Zellen wurden mit GI bzw. GW (beide 10  $\mu$ M) oder PMA (200ng/ml) inkubiert. Nach 4 Stunden wurde der Überstand abgenommen und im ELSIA die Konzentration des freigesetzten mCXCL16 gemessen. Die \* entsprechen einer Signifikanz  $p < 0,05$  zwischen den inhibierten Zellen und den unbehandelten Zellen.

In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob das CXCL16 *Shedding* nach gründlichem Auswaschen des Metalloproteinaseinhibitors GI254023X mit PBS wieder hergestellt werden kann. Hierfür wurden HaCaT- Zellen in zwei Schritten mit GI254023X behandelt bzw. unbehandelt belassen. Nach der ersten zweistündigen Behandlung konnte ein deutlicher Effekt zwischen behandelten (Ansatz 3 und 4) und unbehandelten (Ansatz 1 und 2) Keratinozyten festgestellt werden (Abb. 3.11). Der zweiten Behandlung wurden nur die Ansätze 2 und 4 unterzogen. In den Ansätzen 1 und 3 zeigten sich abschließend höhere Konzentrationen im Vergleich zu den Ansätzen 2 und 4, die zuletzt mit dem Inhibitor behandelt wurden. Da die Konzentration in Ansatz 3 zudem höher war als in Ansatz 2, scheint der Zeitpunkt der Inhibitorbehandlung ausschlaggebend zu sein. Dieses könnte bedeuten, dass die Inhibition des hCXCL16 *Shedding* reversibel ist.

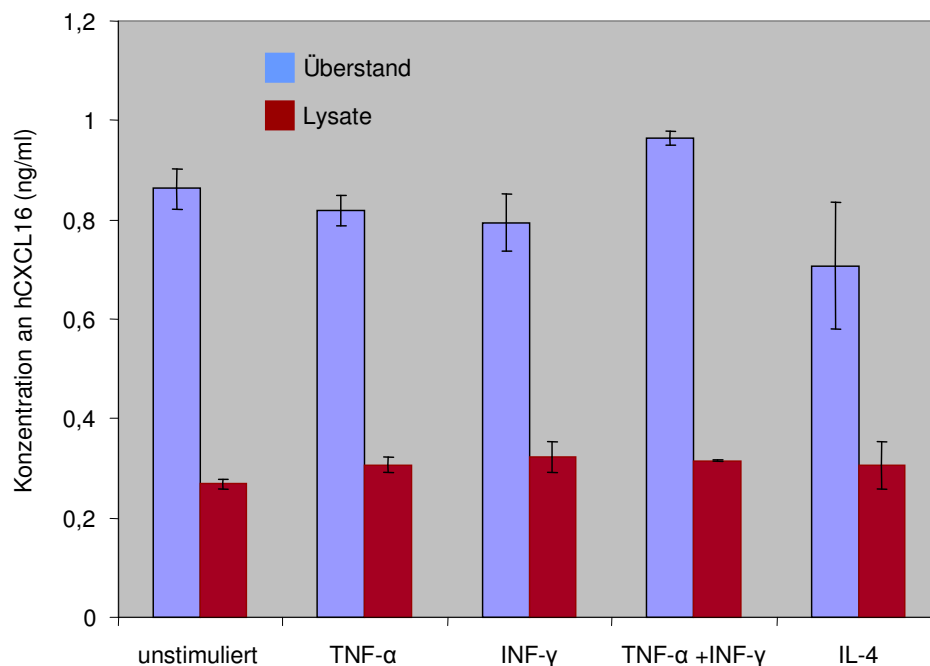


**Abb. 3.11 Wiederherstellung des CXCL16 Shedding nach Entfernung der Metalloproteinaseinhibitoren.** Der spezifische Inhibitor GI254023X für ADAM10 wurde in einer Konzentration von 10 $\mu$ M zur Hemmung des CXCL16 Shedding in HaCaT- Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in zwei Behandlungsschritten mit bzw. ohne GI254023X für jeweils zwei Stunden inkubiert. Zwischen den einzelnen Behandlungen wurden die Zellen jeweils zweimal mit 1ml PBS gewaschen. Überstände und Lysate wurden im ELISA auf ihren Gehalt an löslichem hCXCL16 gemessen. Das \* entspricht einer Signifikanz  $P < 0,05$  zwischen den Zellen des Versuchsansatzes 2 und 3 in der 2. Behandlungsphase.

### 3.3. Keine signifikante Regulation der CXCL16- Expression in Keratinozyten durch die Zytokine TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ und IL- 4

Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob Keratinozyten im Zellkulturversuch, wie für die ECV- 304 Zellen in der Arbeit von Abel et al. 2004 beschrieben, durch proinflammatorische Zytokine ihre Expression an hCXCL16 regulieren können [36]. In diesen Versuchen wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ , ihre Kombination sowie das anti- inflammatorische IL-4 verwendet. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass INF-  $\gamma$  eine induktive Expression von CXCL9, CXCL10 und CX3CL1 bewirkt [86-88]. Die Versuchsansätze wurden jeweils 24 Stunden in Anwesenheit des Stimulus in einer Konzentration von 10ng/ml inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 8 Stunden inkubiert. Es stellte

sich heraus, dass keines der Zytokine zu einer verstärkten Proteinbiosynthese von hCXCL16 in Keratinozyten sorgte (Abb.3.12).

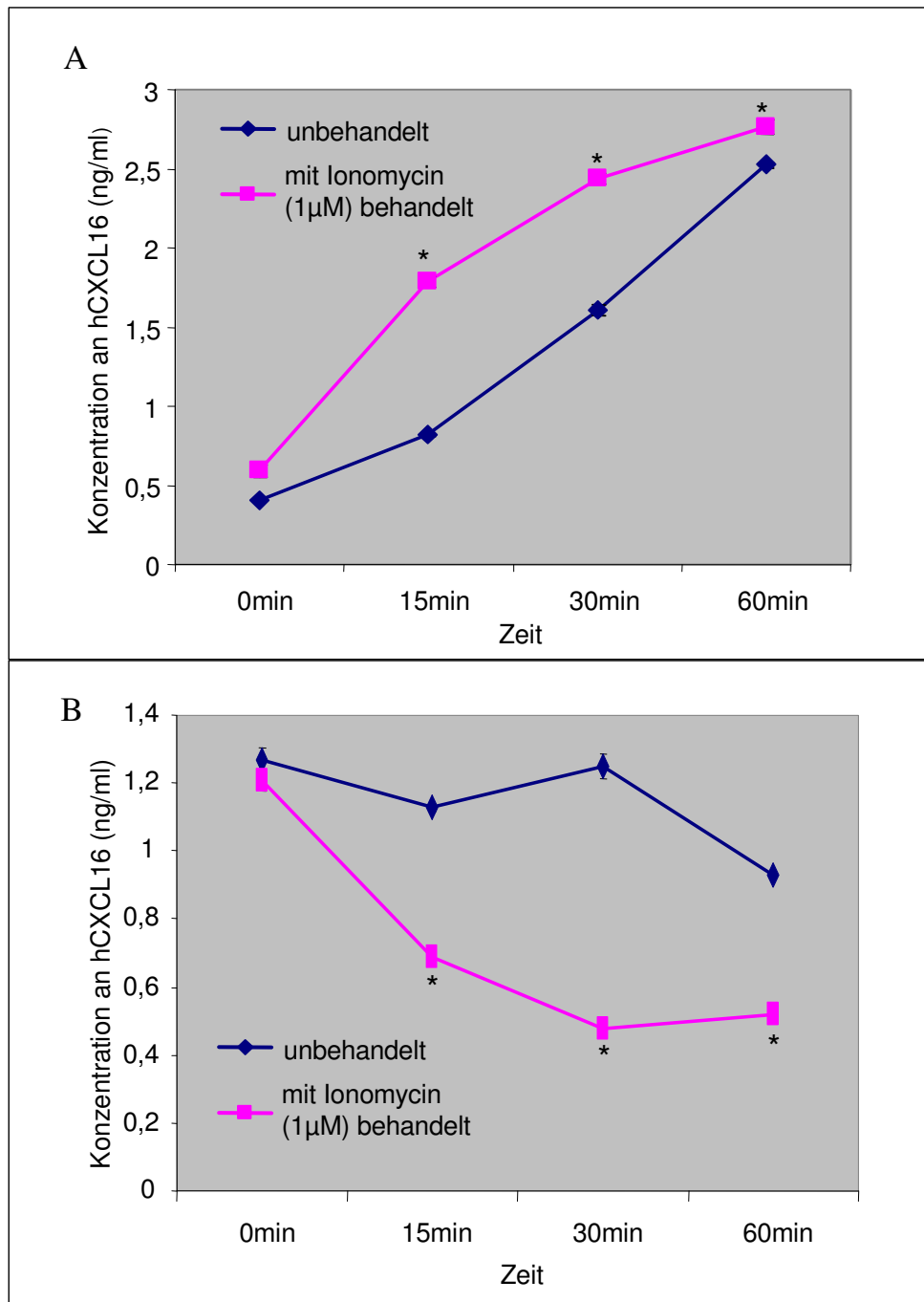


**Abb. 3.12 Effekt verschiedener Zytokine auf die Expression und Freisetzung von CXCL16 durch HaCaT- Zellen.** Die einzelnen Zytokine wurden in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24Std. wurden die Überstände und Lysate im ELISA auf ihre Konzentration an hCXCL16 hin bestimmt.

### 3.4. ADAM10- vermittelte Induzierbarkeit von CXCL16 *Shedding* durch Ionomycin

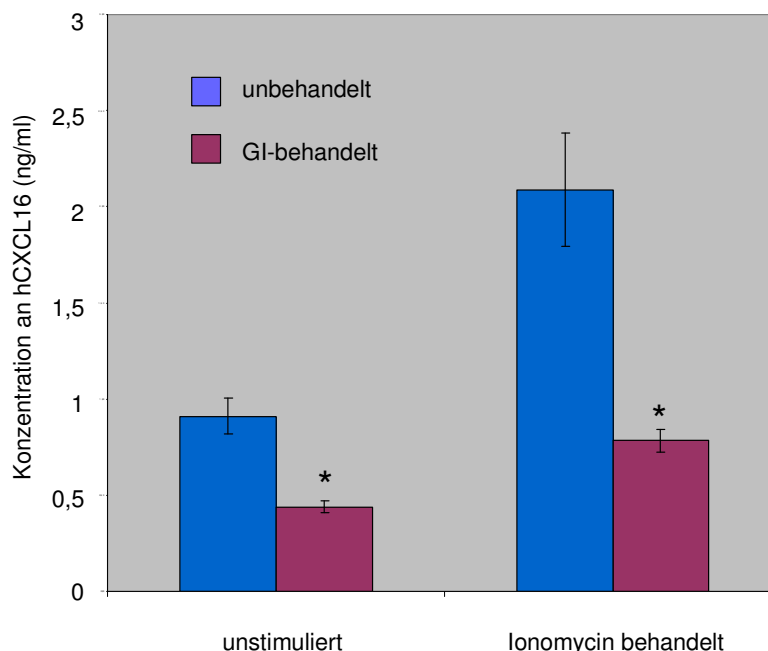
Um zu testen, ob die konstitutive Abgabe von CXCL16 in Keratinozyten gesteigert werden kann, wurden die Zellen mit dem Kalzium- Ionophor Ionomycin behandelt. Ionomycin sorgt für eine Verstärkung der ADAM10- Aktivität, erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration und aktiviert auf diese Weise kalziumabhängige Prozesse [62; 89-90]. Wie bereits durch Dr. rer. nat. C. Hundhausen in seiner Dissertation für transfizierte COS-7- Zellen beschrieben, führte Ionomycin auch bei HaCaT- Zellen innerhalb von 15 Minuten zu einer rapiden Freisetzung von löslichem hCXCL16. Nach einer Stunde glichen sich die Konzentrationen des löslichen hCXCL16 in den Überständen langsam wieder an (Abb. 3.13A). In den Lysaten nahm die Konzentration an zellassoziertem hCXCL16 schon nach etwa 15 Minuten Ionomycin- Behandlung stark ab. Nach Inkubationszeiten über 30 Minuten reduzierte sich die CXCL16- Konzentration in den Lysaten nicht weiter (Abb. 3.13B). Die Ursache hierfür sowie für die Maximalmenge an freigesetztem löslichem hCXCL16 könnte auf einen Regulations-

mechanismus für das CXCL16- *Shedding* hinweisen, der eine bestimmte Minimal-Expression des Chemokins auf der Zelloberfläche gewährleistet. Eine andere Möglichkeit ist, dass Ionomycin zu einem vollständigen Verlust des zellassoziierten CXCL16 geführt hat und nach 30min nur noch die intrazellulären, intermediären CXCL16- Variaten detektiert werden.



**Abb. 3.13 Regulation des CXCL16 *Shedding* auf HaCaT- Zellen durch Ionomycin.** Die Konzentration der Ionomycingabe betrug 1μM. Nach verschiedenen langen Zeitintervallen wurden in **A** Überstände abgenommen bzw. in **B** Lysate erstellt und auf ihre Konzentration an hCXCL16 mittels ELISA untersucht. Die \* entsprechen einer Signifikanz  $p < 0,05$  zwischen den stimulierten Zellen und den unbehandelten Zellen.

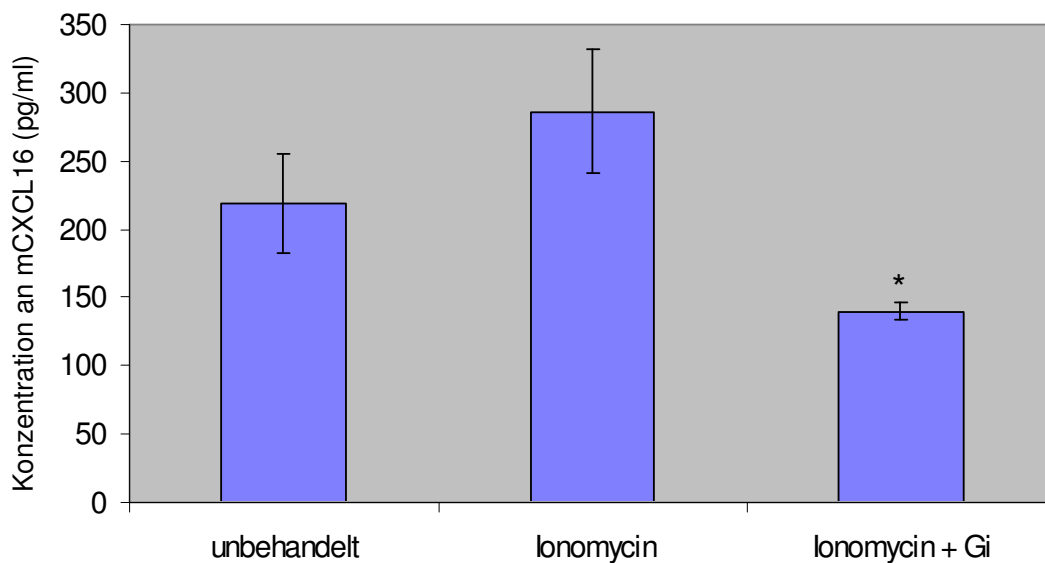
Jetzt sollte festgestellt werden, ob die am *Shedding* beteiligte Protease ADAM10 (spezifischer Inhibitor: GI254023X) auch an der durch Ionomycin induzierbaren Freisetzung von hCXCL16 beteiligt ist. Der bereits beschriebene Effekt (vgl. Abb. 3.8B) der Inhibition durch den Metalloproteinaseninhibitor GI254023X (ADAM10) sowie der proteolytische Spaltungseffekt durch Ionomycin (vgl. Abb. 3.13) konnte reproduziert werden (Abb. 3.14). Betrachtet man die mit GI254023X vorbehandelten Keratinozyten, denen nach 5 Minuten Ionomycin zugegeben wurde, ist die nahezu komplette Aufhebung des Ionomycin-Effektes sichtbar. Dieses deutet auf die Beteiligung von ADAM10 für die durch Ionomycin induzierte proteolytische Spaltung von CXCL16 in Keratinozyten hin.



**Abb. 3.14: Aufhebung der durch Ionomycin vermittelten Freisetzung von CXCL16 durch den ADAM10-Inhibitor GI254023X.** Die Zellen wurden mit 1 $\mu$ M Ionomycin 30min lang stimuliert bzw. unstimuliert belassen. Nach der Inkubation wurden die Überstände abgenommen und im ELSIA auf lösliches CXCL16 gemessen. Die \* entsprechen jeweils  $p < 0,05$  zwischen den inhibierten Zellen und den unbehandelten Zellen.

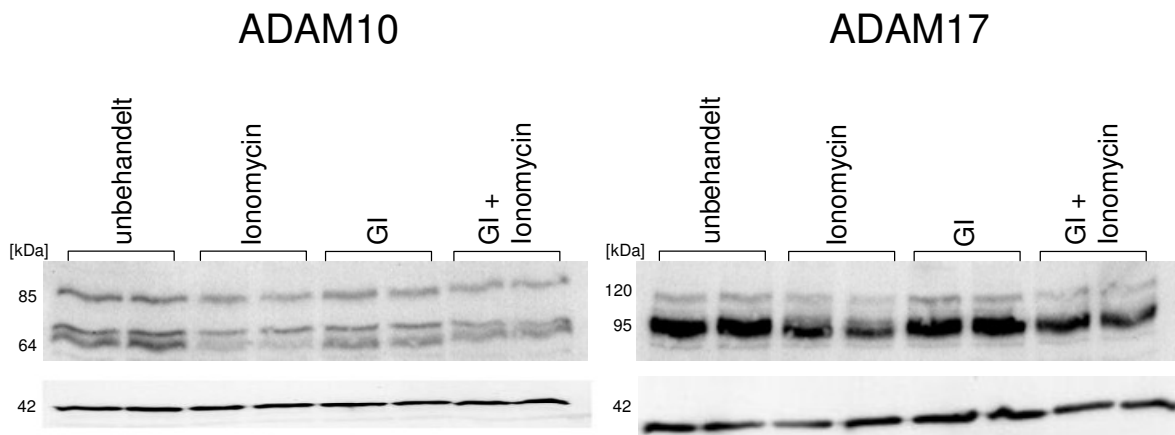
Um die These der Beteiligung des ADAM10 für die durch Ionomycin induzierte proteolytische Spaltung von CXCL16 in Keratinozyten zu stärken, wurden weitere Zellkulturversuche mit den murinen Keratinozyten der PAM212-Zelllinie durchgeführt. Die Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen wie im Versuch der Abbildung 3.14 durchgeführt. Die Versuche ergaben einen leicht schwächeren Ionomycineffekt,

aber die gleich starke Aufhebung desselben durch den Metalloproteinaseinhibitoren GI254023X in den PAM212- Zellen.



**Abb. 3.15 Aufhebung der durch Ionomycin vermittelten Freisetzung von mCXCL16 durch den ADAM10- Inhibitor GI254023X in PAM212- Zellen.** Die Zellen wurden unbehandelt belassen, ausschließlich mit Ionomycin behandelt bzw. 5min. mit GI254023X vorinkubiert und anschließend mit Ionomycin behandelt. Nach 30minütiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und im ELSIA auf die Konzentration an löslichem mCXCL16 gemessen. Das \* entspricht einer Signifikanz von  $P=0,05$  zwischen den stimulierten und den vorinkubierten stimulierten Zellen.

Um die Expression und potentielle Regulation der Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 in HaCaT- Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen 30 Minuten lang mit Ionomycin, GI254023X und deren Kombination behandelt. Anschließend wurden Zelllysate erstellt und nach SDS- PAGE im *Westernblot* mit einem Antikörper gegen ADAM10 und ADAM17 analysiert. Es zeigte sich, dass durch die Ionomycinbehandlung insbesondere die mature Form des ADAM10 aber auch ihre Proform abnimmt. Dieser Effekt kann durch Behandlung der Zellen mit der Kombination aus GI254023X und Ionomycin deutlich supprimiert werden. Der Inhibitor alleine hat nahezu keine Auswirkungen auf die Expression von ADAM10. Der Abfall von ADAM10 nach Ionomycinbehandlung und die Aufhebung des Effektes mit GI254023X deutet eine Herabregulation von ADAM10 an, welche durch die Aktivität von Metalloproteinasen, möglicherweise sogar ADAM10 selbst, vermittelt wird. Gleichzeitig wurde der Blot mit einem gegen ADAM17 gerichteten Antikörper analysiert. Es zeigten sich vergleichsweise geringe Veränderungen der muren Form und der Proform des ADAM17 nach Behandlung mit Ionomycin bzw. dem Inhibitor, was darauf hindeutet, dass nach Ionomycinbehandlung insbesondere ADAM10 und ADAM17 nur im geringen Ausmaß einer proteolytischen Regulation unterliegen.

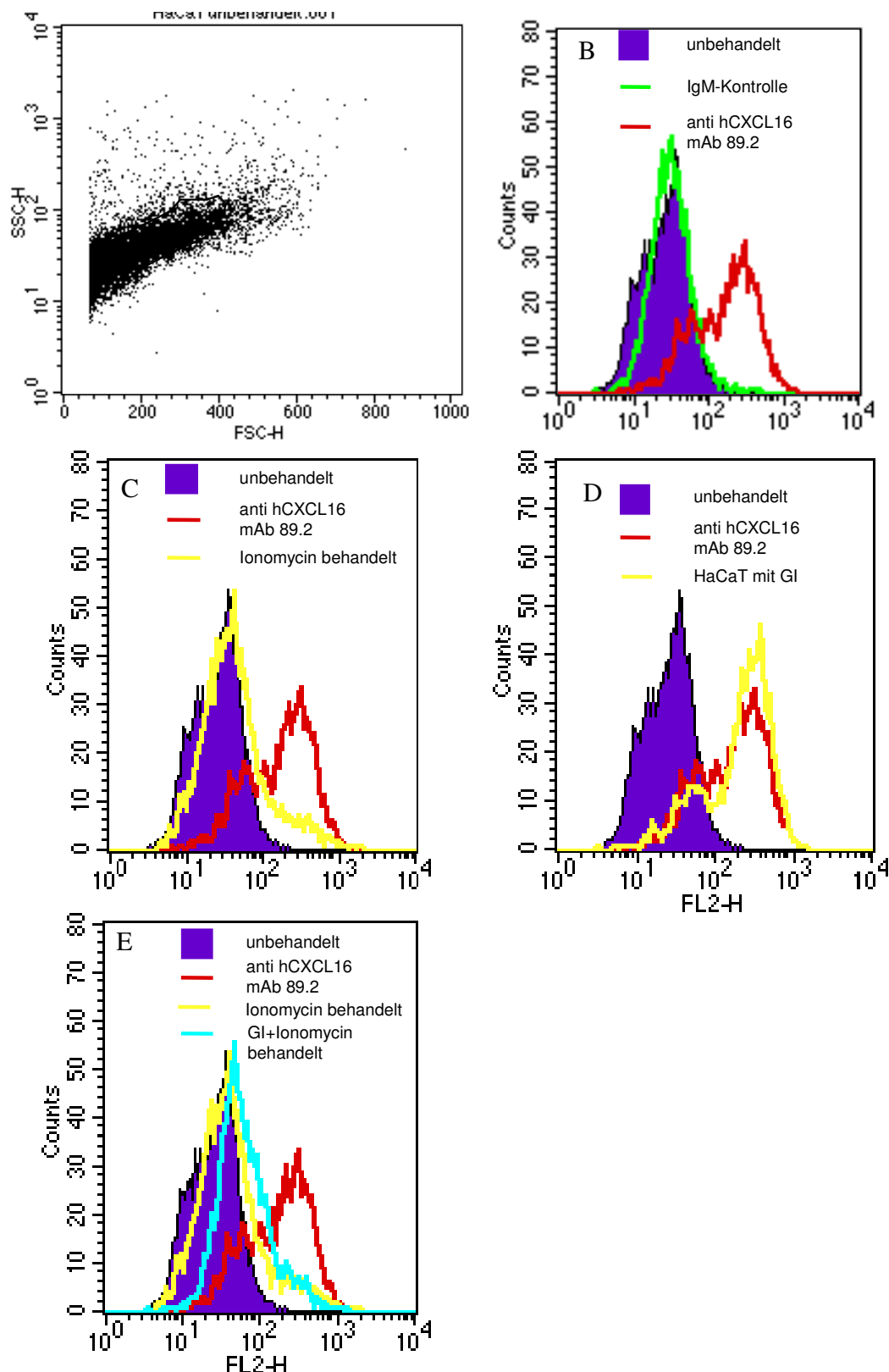


**Abb. 3.16 Einfluss von Ionomycin und GI auf die Expression von ADAM10 und ADAM17 in HaCaT- Zellen.** Die Zellen wurden mit Ionomycin (1 $\mu$ M) und GI254023X (10 $\mu$ M) 30min lang inkubiert. Die Lysate wurden in einem 7% SDS- Polyacrylamid- Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mittels *Western Blot* Verfahren auf eine Membran übertragen und mit einem spezifisch gegen den C-Terminus von ADAM10 sowie ADAM17 gerichteten Antiserum aus Kaninchen inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem POD- gekoppelten Sekundärantikörper. Anschließend wurde der Blot mit einem Antiserum gegen  $\beta$ - Aktin inkubiert, um Varianzen in der Proteinmenge auszu-schließen.

Durch die ELISA- Versuche konnte eindeutig die Relevanz für das ADAM10 an der proteolytischen Spaltung von CXCL16 in humanen als auch in murinen Keratinozyten nachgewiesen werden. Nun sollten ebenfalls die Regulationsmechanismen von hCXCL16 mittels durchflusszytometrischer Messung bestimmt werden. Da die käuflich erworbenen Antikörper für die Messung von Regulationsmechanismen mittels Durchflusszytometrie zu wenig sensitiv waren, wurde ein sensitiver monoklonaler CXCL16- Antikörper mit Hilfe der Hybridomtechnik durch die Diplom- Biochemikerin Salvinia Mletzko und Dr. rer. nat. Alexander Schulte hergestellt (Herstellung nachlesbar in der Diplomarbeit von Salvinia Mletzko und der Dissertation von Alexander Schulte). Es zeigten sich deutliche Signale mit dem hCXCL16mAb89.2- Antikörper gegen hCXCL16 von transient transfizierten HEK293- Zellen. Als Isotypantikörper wurde ein kommerzieller IgM- Isotypantikörper verwendet.

Zunächst sollte geprüft werden, ob der erstellte Antikörper Signale in HaCaT- Zellen mittels Durchflusszytometrie liefert. Der hCXCL16mAb89.2- Antikörper lieferte ein eindeutiges Signal gegenüber den unbehandelten und den mit dem IgM-Isotypantikörper inkubierten Zellen. Der Isotypantikörper (grün) ergab eine geringe Fluoreszenz (MF= 28,39). Auf den nur mit den sekundär PE- gekoppelten Zellen (blau) wurde die geringste Fluoreszenz gemessen (MF= 26,66). Zellen mit Antikörpern





**Abb. 3.17** Effekt von Ionomycin auf die Oberflächenexpression von hCXCL16 auf HaCaT- Zellen. HaCaT- Zellen wurden mit Ionomycin in An- und Abwesenheit von Metalloproteinaseinhibitor stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Oberflächenexpression des CXCL16 wurde mit einem gegen hCXCL16 gerichteten monoklonalen Antikörper untersucht. Als Sekundärantikörper diente ein PE- gekoppelter, gegen Maus- IgG gerichteter Antikörper, der anschließend im Durchflusszytometer analysiert wurde. Abbildung A zeigt eine Darstellung der Zellen im Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht. Die übrigen Abbildungen zeigen den Nachweis der Expression von CXCL16 auf der Zelloberfläche (Abbildung B) sowie deren Regulation durch Ionomycin (Abbildung C), durch den Inhibitor GI254023X (Abbildung D) und die Aufhebung des Ionomycineffektes durch GI254023X (Abbildung E).

gegen das hCXCL16 und sekundär PE- gekoppelten Antikörper (rot) zeigten gegenüber den anderen Zellen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz (MF= 181,06) (Abb. 3.18B).

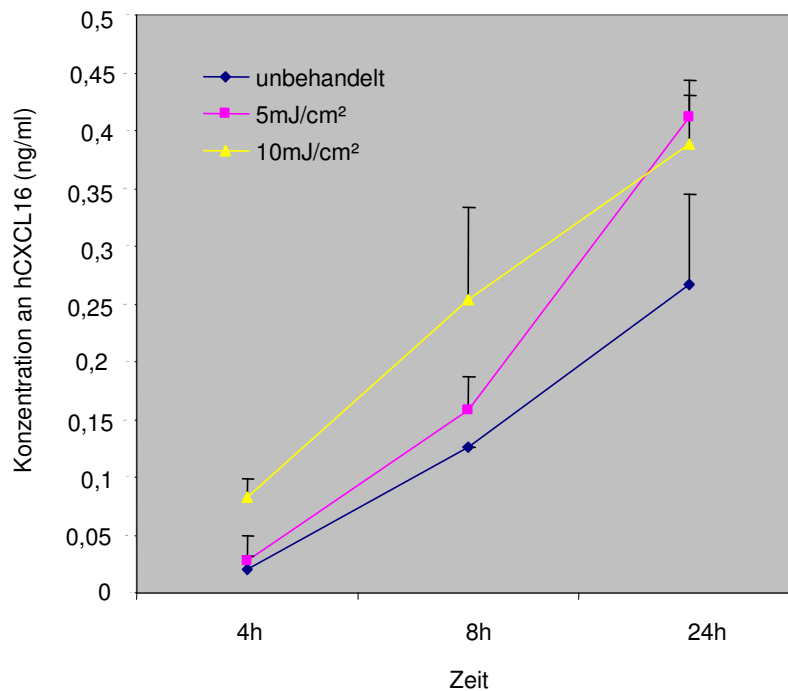
Hiernach sollte mittels Durchflusszytometrie die Regulierung der Oberflächenexpression von hCXCL16 durch den Inhibitor GI254023X und das Stimulanz Ionomycin bzw. deren Kombination ermittelt werden. Es zeigte sich eine deutliche Verringerung des Fluoreszenzsignals (MF= 33,08) für hCXCL16 durch Ionomycinbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten (MF= 181,06) Keratinozyten (Abb. 3.18C). Des Weiteren war eine leichte Verschiebung durch die Inhibition von GI254023X (MF= 237,14) zu erkennen (Abb. 3.17E). Die Vorinkubation mit dem Metalloproteinaseinhibitor GI254023X von 5 Minuten Dauer ergab eine deutliche Aufhebung des Ionomycineffektes (MF= 49,58) im Fluoreszenzsignal (Abb. 3.17D). Diese Ergebnisse und die im Vorfeld ermittelten ELISA- Daten stärken die These, dass ADAM10 an der Regulation von CXCL16 beteiligt ist.

### **3.5. UV- B hat Einfluss auf das *Shedding* von CXCL16**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob neben Ionomycin auch andere physiologische Stimuli das *Shedding* von CXCL16 hochregulieren können. Ein physiologisch relevanter Reiz für Keratinozyten ist UV- B. UV- B mit einer Wellenlänge von 290nm bis 320nm wirkt schädigend auf die DNA von Keratinozyten [91]. UV- B- Strahlung dringt nur in oberflächliche Hautschichten ein und trifft auch die Melanozyten, welche für die Synthese, Speicherung und Abgabe von Melanin verantwortlich sind. Melanozyten sind im Stratum basale der Epidermis lokalisiert und besitzen zahlreiche langgestreckte zytoplasmatische Fortsätze, die sich weit zwischen die benachbarten Epithelzellen vorschieben. Die Melanozyten geben ihr Syntheseprodukt Melanin an die Keratinozyten ab. Melanin schützt durch Absorption der UV- Strahlung vor Zellschäden. Ein Sonnenbrand (UV- Erythem) tritt nach übermäßiger Sonnenexposition auf, beginnend mit Rötung und Jucken der Haut über Schwellung und Schmerzen bis hin zur Blasenbildung [74].

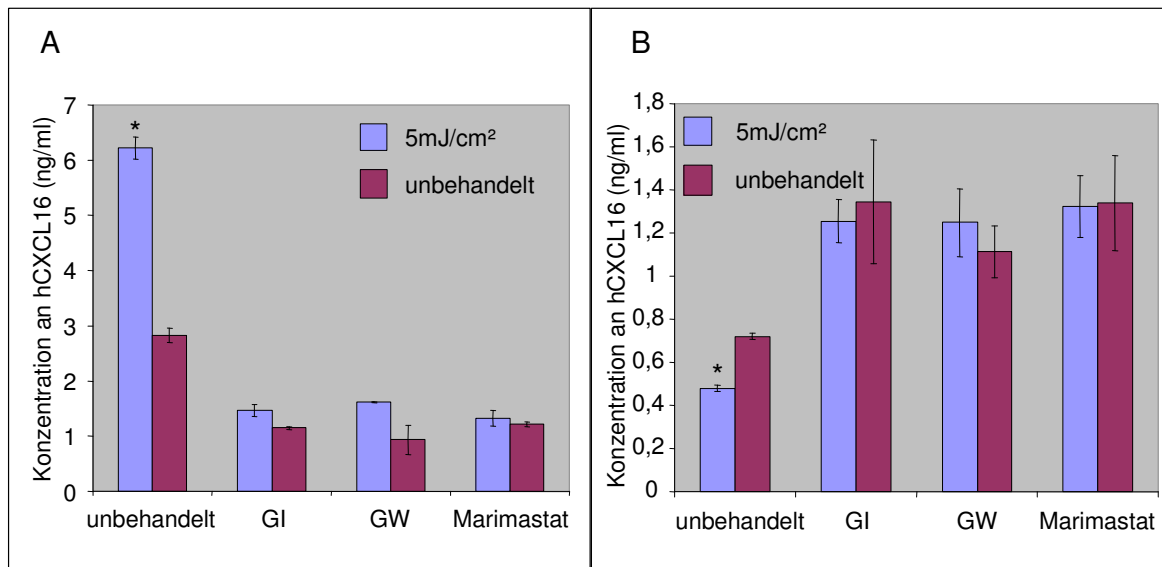
Für die Versuchsreihe wurden HaCaT- Zellen verwendet. Die UV- B- Dosen von 5 und 10mJ/cm<sup>2</sup> wurden so gewählt, dass keine Apoptose eintreten konnte, da Bestrahlungsdosen bis 150mJ/cm<sup>2</sup> reparabel sind [2]. Bereits vier Stunden nach der UV- B- Bestrahlung mit 10mJ/cm<sup>2</sup> wurde das Dreifache an hCXCL16 freigesetzt. Mit einer Dosis von 5mJ/cm<sup>2</sup> war nach 24 Stunden eine deutlich erhöhte Konzentration an

hCXCL16 freigesetzt (Abb. 3.18). Dieses spricht für eine bestrahlungsdosisabhängige Steigerung des *hCXCL16- Sheddings* in HaCaT- Zellen.



**Abb. 3.18 Einfluss von UV- B – Bestrahlung auf die Freisetzung von CXCL16 durch HaCaT-Zellen.** HaCaT- Zellen wurden mit  $5\text{mJ}/\text{cm}^2$  bzw.  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$  UV- B bestrahlt und nach verschiedenen Zeitintervallen auf die Konzentration von freigesetztem CXCL16 im ELISA hin untersucht.

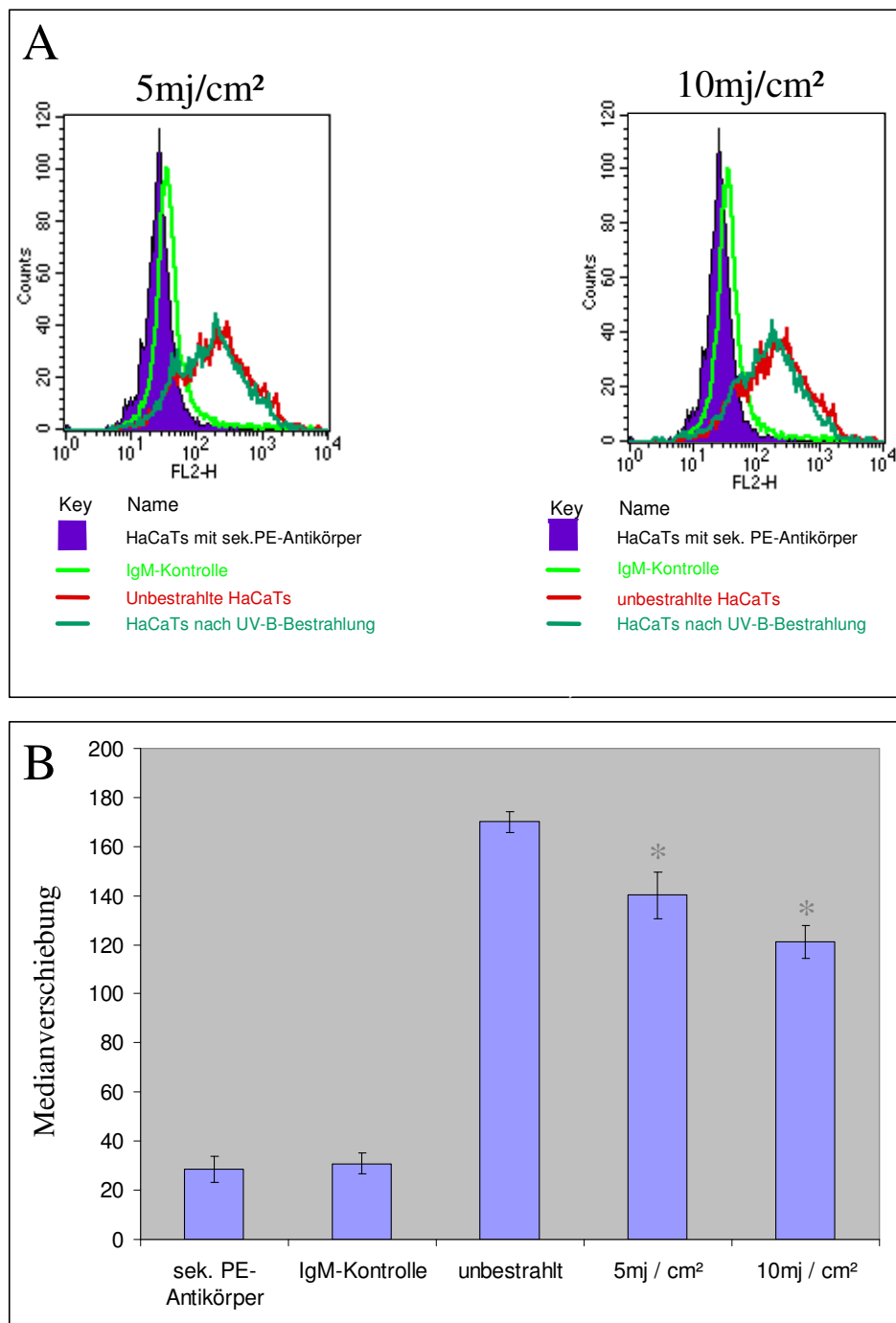
Im weiteren Verlauf sollte getestet werden, ob die strahleninduzierte Steigerung der Freisetzung an hCXCL16 durch die Metalloproteinaseinhibitoren GI254023X, GW280264X und Marimastat inhibiert werden kann. Durch die Inhibitoren ließ sich das erhöhte *Shedding*, welches durch die Bestrahlung hervorgerufen wurde, inhibieren (Abb. 3.19). Metalloproteinaseinhibitoren hemmen anscheinend das UV-induzierte *Shedding*, welches somit über die Metalloproteinasen reguliert wird.



**Abb. 3.19 Nachweis der Inhibition der Metalloproteinasen durch GI254023X, GW280264X und Marimastat nach UV- B- Bestrahlung bei HaCaT- Zellen.** HaCaT- Zellen wurden, mit 5mJ/cm<sup>2</sup> UV- B bestrahlt, mit frischem Medium mit bzw. ohne GI oder GW (beide 3µM) versorgt, und anschließend für 24Std weiter inkubiert. Überstände (A) und Lysate (B) wurden im ELISA auf ihre Konzentration an freigesetztem CXCL16 hin untersucht. Das \* zeigt die statistische Signifikanz zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten HaCaT-Zellen.

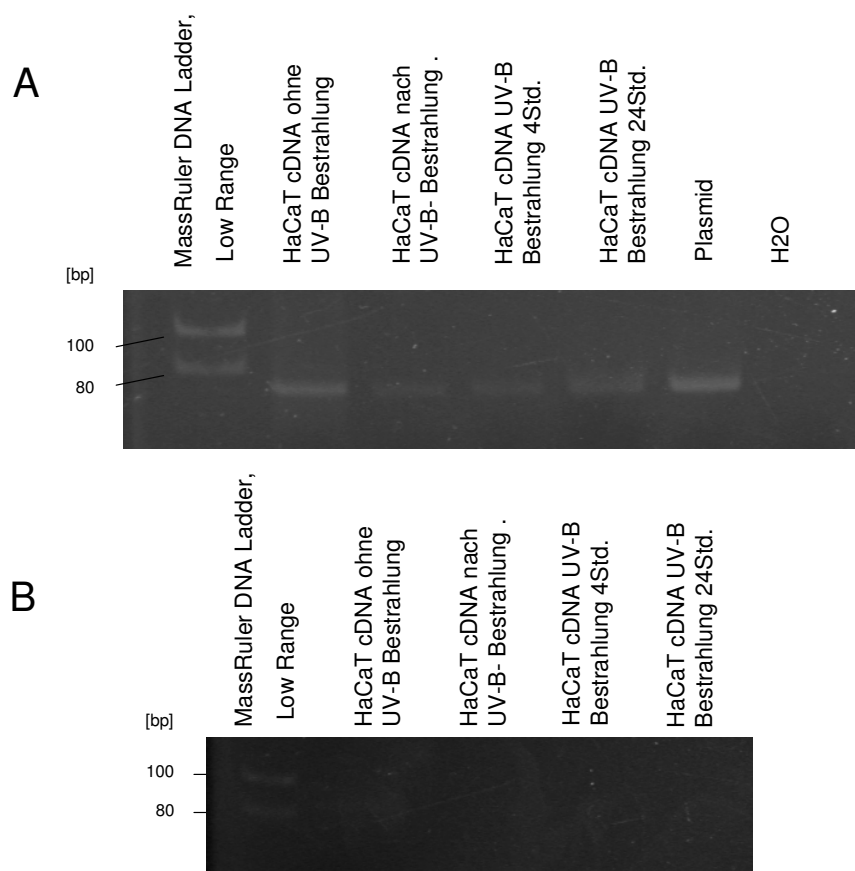
Ebenfalls sollte die Oberflächenexpression des hCXCL16 auf HaCaT- Zellen nach einer UV- B- Behandlung mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Hierzu dienen der hCXCL16mAb89.2- Antikörper als primärer Antikörper, als sekundärer ein PE- gekoppelter und als Kontrolle ein IgM- Isotyp- Antikörper. Die Daten zeigten, dass sich die ELISA- Experimente im Durchflusszytometer bestätigen ließen. Die IgM- Isotypkontrolle (hellgrün) ergab eine geringe Fluoreszenz (MF= 30,86). Die nur mit dem sekundären PE- gekoppelten Antikörper detektierten Zellen (blau) ergaben die geringste Fluoreszenz (MF= 28,58). Die mit dem gegen das hCXCL16 gerichteten und dem sekundären PE- gekoppelten Antikörper behandelten, aber unbestrahlten Zellen (rot) zeigten gegenüber den anderen Zellen die höchste Fluoreszenz (MF= 170,05). Die UV- B bestrahlten Zellen (5 bzw. 10mJ/cm<sup>2</sup>) erzielten eine deutlich höhere Fluoreszenz als die IgM- Isotypkontrolle, jedoch eine geringere Fluoreszenz als die unbestrahlten Zellen (MF für 5mJ/cm<sup>2</sup>= 140,2; MF für 10mJ/cm<sup>2</sup>= 121,3) (Abb. 3.20A). Dies lässt vermuten, dass auf Keratinozyten nach einer UV- B- Bestrahlung mehr CXCL16 proteolytisch gespalten wird. Da in der Durchflusszytometrie die Abbildungen logarithmisch dargestellt werden, ist scheinbar nur eine schwache Ab-

nahme der Fluoreszenz im Histogramm erkennbar (Abb. 3.20A). Das Ergebnis lässt sich durch ein Balkendiagramm besser verdeutlichen (Abb. 3.20B).



**Abb. 3.20 Nachweis des hCXCL16- Sheddings auf HaCaT- Zellen nach UV- B- Bestrahlung.** HaCaT- Zellen wurden mit 5 bzw. 10mJ/cm<sup>2</sup> UV- B bestrahlt und für vier Stunden in serumhaltigem Medium inkubiert. CXCL16 wurde mit einem gegen hCXCL16 gerichteten monoklonalen Antikörper auf der Zelloberfläche markiert, mit einem PE- gekoppelten Sekundäntikörper gebunden und im Durchflusszytometer gemessen. Darstellung **A** zeigt die Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb der gemessenen Zellpopulation. Zusätzlich wurde aus dem Histogramm die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet. In Abbildung **B** wird die Medianverschiebung als Balkendiagramm zur besseren Verdeutlichung gezeigt. Die \* entsprechen einer Signifikanz in der Medianverschiebung von P<0,05 zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Zellen.

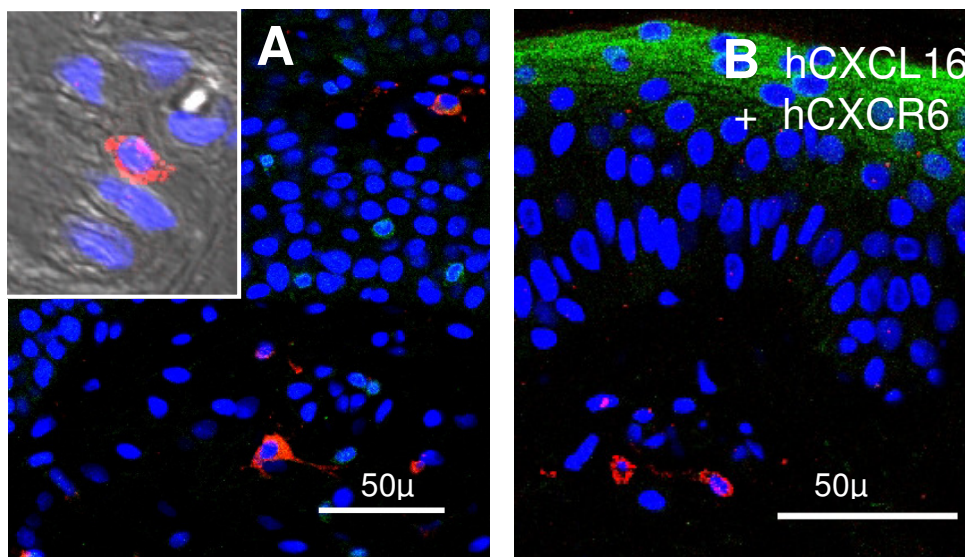
Zum Abschluss der UV-B- Experimente sollte untersucht werden, ob die UV- B-Be- handlung Einfluss auf die Expression von hCXCL16 hat. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Intensität von  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Es wurde die cDNA unbestrahlter HaCaT- Zellen, die cDNA bestrahlter HaCaT- Zellen direkt nach der Bestrahlung, vier und 24 Stunden nach der Bestrahlung gewonnen und durch eine RT- PCR auf die Expression von hCXCL16 untersucht (Abb. 3.21A). Alle bestrahlten Zellen zeigten ein schwächeres Signal als die unbestrahlten Zellen (Abb. 3.21A). Anscheinend sorgt UV-B-Bestrahlung für eine Verringerung der CXCL16- Expression, da für jede Zellprobe ein deutlich geringeres Signal zu erkennen ist.



**Abb. 3.21: Nachweis der hCXCL16- mRNA-Expression mittels RT- PCR.** Die mRNA wurde aus HaCaT- Zellen isoliert, in cDNA revers transkribiert und anschließend mittels einer PCR für CXCL16 unterzogen. Die spezifischen Oligonukleotide wurden so entworfen, dass die CXCL16- cDNA ein Fragment von 75bp ergeben müsste. In der ersten markierten Spur befindet sich ein definierter Marker. Die Größen der einzelnen Fragmente sind in Basenpaaren links der Abbildung angegeben (A). Zur Kontrolle wurde die nicht revers transkribierte RNA Präparation ebenfalls mit aufgetragen (B).

## 3.6. Der Rezeptor CXCR6 befindet sich in der Dermis, aber nicht in der Epidermis

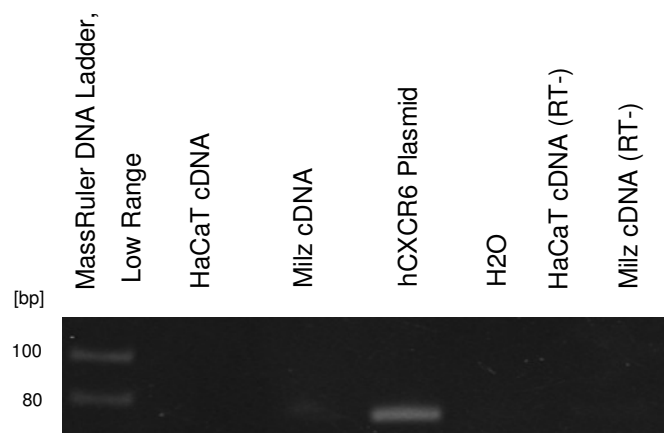
Um erste Hinweise für eine mögliche Funktion von CXCL16 in der Haut zu erhalten, wurde die Expression des CXCL16- Rezeptors CXCR6 mittels Immunfloreszens in humaner Haut untersucht. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Dr. rer. nat. Felix Scholz, Dermatologie Kiel durchgeführt. Es kam hierbei ein monoklonaler Antikörper gegen CXCR6 zum Einsatz, mit dem CXCR6 in Zellen nachgewiesen werden konnte, die nur vereinzelt in der Dermis, jedoch nicht in der Epidermis vorkamen (Abb. 3.22). Dieses deutet darauf hin, dass CXCR6 zwar in Zellen der Haut vorkommt, aber nicht von Keratinozyten exprimiert wird.



**Abb. 3.22 Nachweis von CXCL16 und CXCR6 in gesunder Haut mittels indirekter Immunfluoreszenz.** Als Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst genutzt (blau). Die Färbungen wurden mit anti-CXCR6 (roter Kanal) und anti- CXCL16 (grüner Kanal) durchgeführt. **A** Darstellung von hCXCR6-positiven Zellen in der Dermis, **B** Darstellung von hCXCL16- positiven Zellen in der Epidermis und hCXCR6-positiven Zellen in der Kutis.

Um das Ergebnis der Immunhistologie zu bestätigen, wurde eine weitere RT-PCR durchgeführt. Es wurde die cDNA aus HaCaT- Zellen gewonnen und durch eine RT-PCR auf die Expression von hCXCR6 untersucht. Als Kontrolle dienten ein Plasmid und eine Milzprobe. Es konnte für HaCaT- Zellen keine CXCR6 Expression nachgewiesen werden. Für das Plasmid und die Milzprobe ergab sich ein eindeutiges Signal bei 64bp. (Abb. 3.23). Dieses spiegelt die Ergebnisse aus der Immunhistologie wieder. CXCR6 scheint von Keratinozyten nicht exprimiert zu werden. Als Positiv-kon-

trolle wurden Zellen der Milz verwendet, in denen mittels RT- PCR CXCR6 cDNA nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 3.23: Analyse der hCXCR6- mRNA- Expression mittels RT- PCR.** Aus HaCaT- Zellen wurde mRNA isoliert, diese in cDNA revers transkribiert und anschließend einer PCR mit spezifischen Oligonukleotid- Primern für CXCR- 6 unterzogen. Die spezifischen Oligonukleotide wurden so entworfen, dass die amplifizierte DNA ein Fragment von 64bp ergibt. In der ersten markierten Spur befindet sich ein definierter Marker. Die Größen der einzelnen Fragmente sind in Basenpaaren links der Abbildung angegeben.



### 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Expression und die proteolytische Spaltung des transmembranen Chemokins CXCL16 in der Haut untersucht. Anfangs gab es erste Hinweise innerhalb der Arbeitsgruppen von Prof. Proksch und Dr. Ludwig auf die Expression von CXCL16 durch die Immunhistologie, die eine Immunreaktivität auf der Oberfläche von gesunden Keratinozyten zeigte und sich über die gesamte Epidermis, mit Ausnahme des *Stratum corneum*s, erstreckte. Es war bereits bekannt, dass CXCL16 in einer Reihe von unterschiedlichen Geweben exprimiert wird, unter anderem in der Milz, in der Lunge, den Nieren, in den Peyer-Plaques des Darmtraktes sowie in der Leber [32; 36-39; 41-43]. In Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Gliazellen wurde das Chemokin nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen [36; 41]. Weiterhin war bekannt, dass das CXCL16 in antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen und Epithelzellen auf mRNA-Ebene nachweisbar ist [19; 32; 36]. Nach neusten Untersuchungen konnte hCXCL16 auch in gingivalen Fibroblasten nachgewiesen werden [40]. Keratinozyten konnten durch diverse Arbeiten als wichtige Chemokinproduzenten in der Haut identifiziert werden [5; 6-8]. Es standen weder auf der mRNA- noch auf der Proteinebene Daten über die Expression des CXCL16 in Zellen der Haut zur Verfügung. Auch war nichts über die Regulation durch beteiligte Proteasen bekannt.

#### 4.1. CXCL16 wird von Keratinozyten konstitutiv exprimiert

Zuerst wurde das CXCL16 auf mRNA-Ebene in HaCaT-Zellen nachgewiesen. Es zeigte sich ein signifikantes Signal in der RT-PCR. Hiernach folgten *in vitro* die Darstellung der konstitutiven Expression von humanem (h) und murinem (m) CXCL16 in HaCaT- bzw. PAM212-Zellen. In beiden Zelllinien war über die Zeit eine beträchtliche Zunahme der CXCL16-Konzentration im Überstand erkennbar. Ebenfalls wurde mittels Durchflusszytometrie h- und mCXCL16 auf den Zelloberflächen detektiert. Ein Jahr nach Beendigung des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde die konstitutive Expression von hCXCL16 in einer weiteren Studie mittels RT-PCR und ELISA-Technik auf Keratinozyten bestätigt [35].

### **4.2. CXCL16- Expression kann in Keratinozyten durch Mediatoren nicht hoch reguliert werden**

Aufgrund diverser Studien sind Keratinozyten zu wichtigen Chemokinproduzenten in der Haut erklärt worden, die allerdings erst durch die Präsenz von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF-  $\alpha$  und IFN-  $\gamma$  oder durch bakteriellen Kontakt die Chemokinproduktion hoch regulieren [5-8]. In unterschiedlichen Zelltypen, zum Beispiel in glatten Muskelzellen oder Endothelzellen, kommt es durch eine Stimulation von IFN-  $\gamma$  zu einer erhöhten Expression von CX3CL1, CXCL9/10/11 sowie von CXCL16 [36; 46]. In Keratinozyten führt IFN-  $\gamma$  zu einer erhöhten Expression von CX1CL1, CXCL10, CXCL9 [86-87; 93], nicht aber zu einer Expressionserhöhung von CXCL16. Weder eine Stimulation durch TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ , noch eine Kombination aus beidem oder IL- 4 sorgt für eine erhöhte Expression. Die Expression von CXCL16 kann in Keratinozyten nicht durch proinflammatorische Zytokine erhöht werden. Es scheint sich um konstitutive Expression zu handeln. Durch die in *vitro* und in *situ* erhobenen Befunde kann davon ausgegangen werden, dass das CXCL16, nicht wie die meisten anderen in der Haut gefundenen Chemokine, erst unter pathologischen Bedingungen exprimiert wird. Möglicherweise hat das CXCL16 eine andere Funktion, die aber bis dato ungeklärt ist [94].

### **4.3. ADAM10 ist die regulierende Protease für CXCL16 in Keratinozyten**

Es war bereits bekannt, dass unterschiedliche ADAM- Proteasen für die Regulation von Zytokinen in der Haut verantwortlich sind. Es wurde vermutet, dass eine der beiden Metalloproteinasen ADAM10 oder ADAM17 hauptverantwortlich für das *Shedding* von CXCL16 in Keratinozyten sind. Zunächst wurden mittels *Western- Blot*-Verfahren die beiden ADAM- Proteasen, ADAM10 und ADAM17, in HaCaT- Zellen nachgewiesen. Für beide Metalloproteinasen konnte eine Proform und eine mature Form in ihrer spezifischen Größenordnung detektiert werden.

Hiernach wurde der Breitbandinhibitor für Metalloproteinasen Marimastat, der sowohl ADAM10 als auch ADAM17 hemmt, in einer Konzentration von 10 $\mu$ M verwendet. In beiden Zelllinien, HaCaT sowie PAM212, wurde eine Hemmung der proteolytischen Spaltung nach nur einer Stunde festgestellt, die im weiteren zeitlichen Verlauf noch prägnanter wurde. Es bestand die Vermutung, dass ADAM10 hauptverantwortlich für die proteolytische Spaltung von membranständigem CXCL16 in normalen gesunden Keratinozyten ist, so wie es für Endothelzellen, Fibroblasten und Gliomazellen bereits

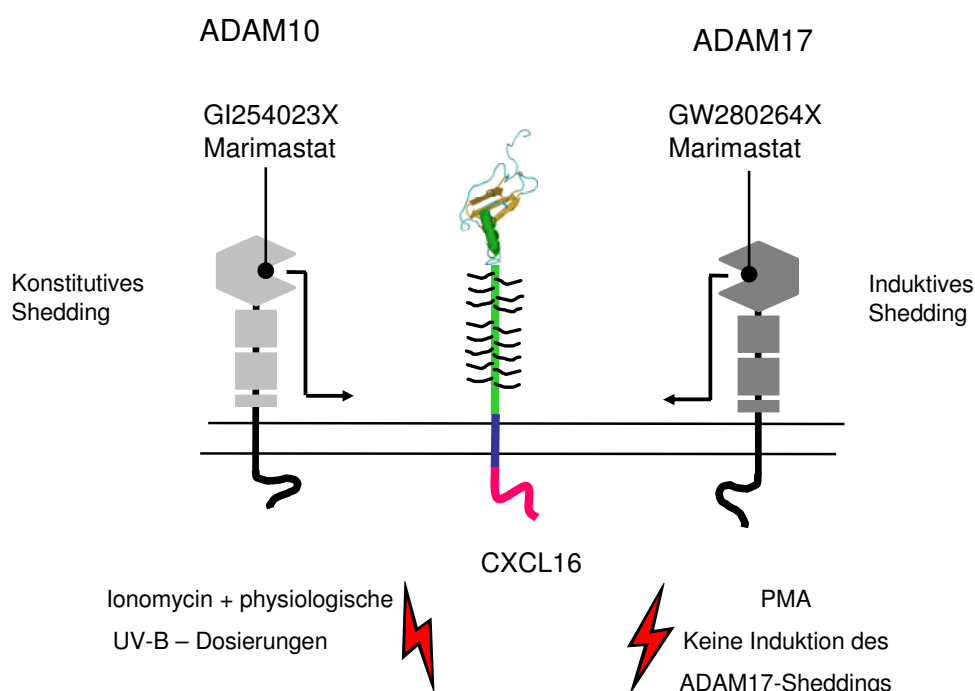
gezeigt werden konnte [36; 43; 51]. Zur Festigung dieser These wurde der ADAM10-spezifische Inhibitor GI254023X verwendet, der zu einer drastischen Reduktion an löslichem CXCL16 im Überstand führte. Durch die Applikation der Spüllösung PBS konnte die Inhibition des GI254023X wieder aufgehoben werden. Nach Auswaschen des Inhibitors kam es wieder zu einer Normalisierung des CXCL16- *Shedding*. Die ADAM10- Inhibition durch GI254023X ist somit reversibel. Durch die Verwendung des Inhibitors GW280264X, der ADAM10 sowie ADAM17 hemmt, konnte keine weitere Hemmung des *Sheddings* erreicht werden.

Ebenfalls wurde festgestellt, dass eine Stimulation der Keratinozyten mit dem PKC-Antagonisten PMA, einem bekannten Stimulans für unterschiedliche ADAM17-*Shedding*- Prozesse [84], keinen Einfluss auf das CXCL16- *Shedding* hat. Andererseits führt eine Stimulation der Keratinozyten durch Ionomycin zu einer erhöhten Freisetzung an CXCL16. GI254023X konnte diese Aktivitätssteigerung wieder aufheben. Ionomycin unterstützt die ADAM10- abhängige Proteolyse durch Anhebung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ - Spiegels, indem es an ADAM10- regulierendes assoziiertes Calmodulin bindet und dadurch eine Dissoziation des assoziierten Calmodulin bewirkt [90; 95]. Diese durch ELISA- Tests gewonnenen Daten konnten durchflusszytometrisch reproduziert werden. Des Weiteren wurde untersucht, ob das erhöhte *Shedding* von CXCL16 nach Ionomycinapplikation durch eine erhöhte Expression von ADAM10 hervorgerufen wird. Mittels *Westernblot*- Analyse konnte keine erhöhte Expression nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise wurde sogar eine Abnahme von ADAM10 im Blot sichtbar. Dieses könnte ein Hinweis auf eine Umverteilung (*Redistribution*) der Proteasen an der Zelloberfläche sein, z.B. eine Akkumulation in bestimmten Bereichen (evtl. *Lipid rafts* / Mikrodomänen). Nach Ionomycin- Behandlung könnte ADAM10 verstärkt zu den *Lipid rafts* rekrutiert werden. *Lipid rafts* können nicht durch 1% Triton (wurde für die Lysatherstellung verwendet) zerstört werden. Hierdurch würde sich die Gesamtmenge an ADAM10 in den *Blots* verringern. Ebenfalls möglich wäre das *Shedding* von ADAM10 durch andere proteolytische Mechanismen. Vielleicht kommt es durch hohen physiologischen Stress zum *Shedding* der Protease durch eine andere Metalloproteinase. Ein derartiger Vorgang wurde bereits für ADAM10 beschrieben (Hatmann et al.)

Da proinflammatorische Mediatoren keinen Einfluss auf die Expression von CXCL16 zu haben scheinen, wurden UV-B- Experimente in physiologischen Dosierungen durchgeführt. Es konnte mittels ELISA- Tests gezeigt werden, dass UV-B- Bestrah-

lung für eine erhöhte proteolytische Spaltung von CXCL16 sorgt, was ebenfalls durchflusszytometrisch nachweisbar war. Unter Verwendung des Breitbandinhibitors Marimastat sowie den spezifischeren Inhibitoren GI254023X und GW280264X konnte demonstriert werden, dass dieser Prozess durch ADAM10- Inhibition aufgehoben werden konnte. Das UV-B- induzierte CXCL16- *Shedding* scheint somit ADAM10- abhängig zu sein. Mittels RT- PCR konnte keine erhöhte Expression von CXCL16 nach UV-B- Bestrahlung festgestellt werden. Damit kann die verstärkte CXCL16- Freisetzung nicht auf die Induktion der Genexpression zurückgeführt werden.

Ebenfalls konnte durch Wundheilungsversuche an gesunden Mäusen festgestellt werden, dass innerhalb von zwei Tagen CXCL16 im Wundexsudat nachweisbar war [77]. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass CXCL16 in Keratinozyten nicht nur konstitutiv exprimiert wird, sondern ebenfalls durch zellulären Stress mittels proteolytische Spaltung verstärkt freigesetzt wird (zum Beispiel durch: Ionomycinbehandlung, mechanische Verletzungen oder UV-B- Strahlung).



**Abb. 4.1. Regulation des CXCL16- *Shedding* in Keratinozyten.** Die *in vitro*- Versuche ergaben, dass ADAM10 hauptverantwortlich für das CXCL16- *Shedding* ist. ADAM10 ist durch Ionomycin und UV- B induzierbar, was wiederum durch GI254023X inhibiert werden kann. GW280264X als ein Inhibitor, der ADAM10 sowie ADAM17 hemmt, bewirkt keine weitere Hemmung des CXCL16-*Sheddings*. Ebenso hat PMA keinen Einfluss auf die CXCL16 *Shedding*- Prozesse. ADAM17 hat keinen Einfluss auf die proteolytische Spaltung des CXCL16 in Keratinozyten.

### 4.4. Biologische Relevanz des CXCL16 in Keratinozyten

Der biologischen Funktion des CXCL16 in der Haut konnte bis dato keine Funktionen zugewiesen werden. Das CXCL16 wurde allerdings für die Eigenschaften der Bindung und der Phagozytose von Bakterien durch Makrophagen verantwortlich gemacht [47]. Weiterhin wurde es auch als so genannter Scavenger- Rezeptor charakterisiert, welcher die Fähigkeit zur Aufnahme und Bindung von oxidiertem LDL besitzt [32]. CXCL16 scheint dort eine entscheidende Rolle in der Atherosklerose inne zu haben [32]. Ebenfalls gibt es Hinweise auf mögliche Identifizierung pathogener Moleküle durch CXCL16. Chemokine, wie die geschnittene Form des CTAPIII/CXCL7, besitzen bakterizide Eigenschaften [96]. Vielleicht dient CXCL16 in löslicher Form auch als ein inflammatorischer Marker [97]. Der Ligand konnte in verschiedenen inflammatorischen Prozessen beschrieben werden, wie zum Beispiel in der Synovialflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis, bei diversen Nierenerkrankungen oder in der glatten Muskulatur der Aorta der Ratte nach IL-18- Induzierung [41; 44; 98]. Zum jetzigen Zeitpunkt kann die Frage noch nicht beantwortet werden, ob das CXCL16 eine Komponente des angeborenen Immunsystems ist und somit eine protektive Rolle in der Haut einnimmt.

In der Studie von Tohyama et al. wurde beschrieben, dass von Keratinozyten freigesetztes hCXCL16 antimikrobiell aktiv sei. *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCXCL16 für zwei Stunden inkubiert. Für *E. coli* wurde eine Überlebensrate von 60% bei einer Konzentration von 10µg/ml abgespaltetem hCXCL16 gemessen. Für *Staph. aureus* konnte sogar eine Überlebensrate von nur 30% bei gleicher Konzentration von hCXCL16 verzeichnet werden [35].

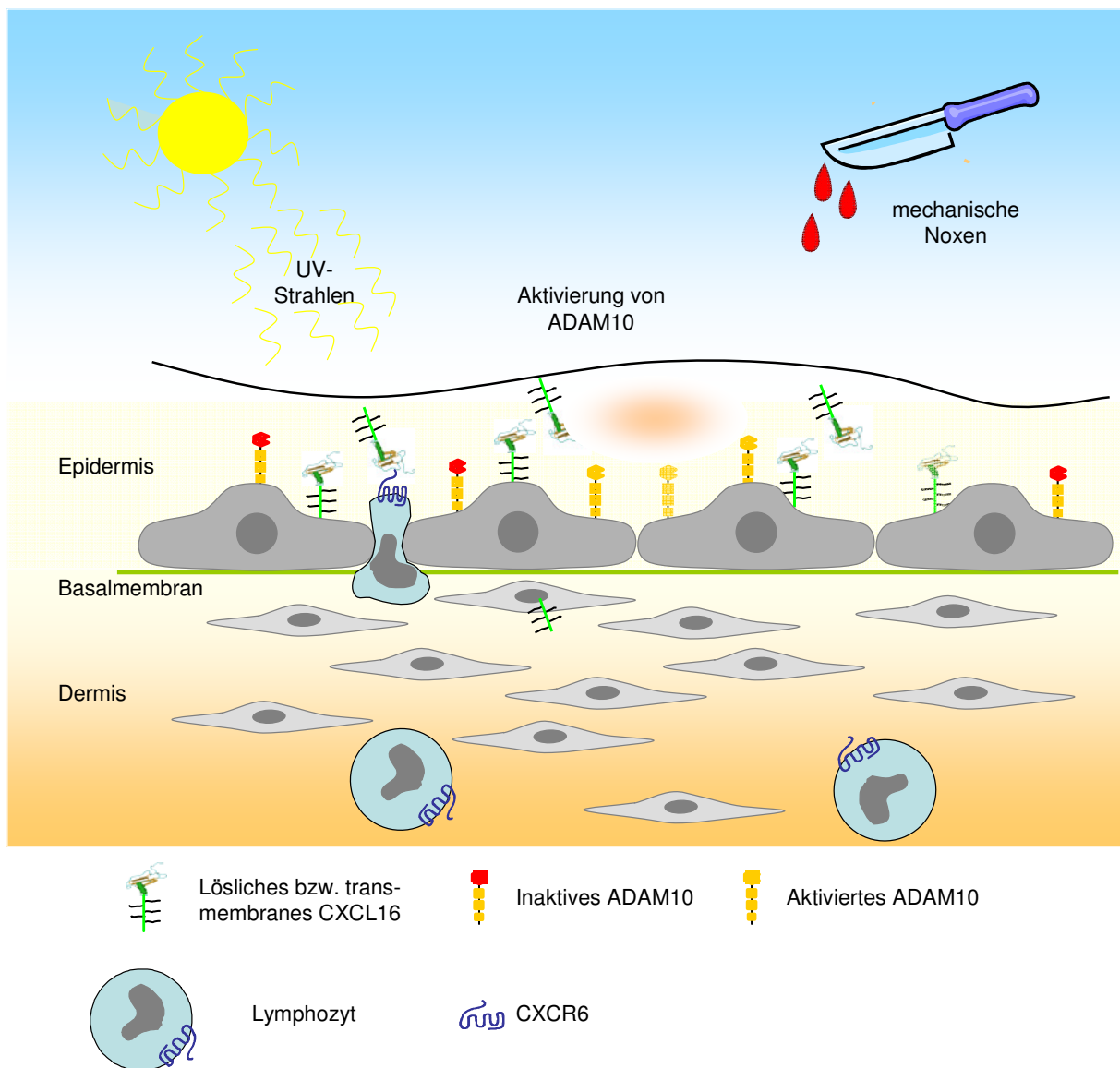
Eindeutig geklärt ist das Binden und die Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR6 durch das CXCL16 [19; 34; 50]. In histologischen Schnitten konnte CXCL16 insbesondere in der Epidermis nachgewiesen werden. CXCL16 fand sich außerdem in den terminalen Blutgefäßen der Dermis [77]. Weiterhin zeigten einige vereinzelte Zellen in der Dermis ein CXCL16- positives Signal, welches aber um ein Vielfaches schwächer war als das der Epidermis. Keratinozyten scheinen somit die Hauptquelle für CXCL16 in gesunder Haut zu sein [77]. CXCR6- immunreaktive Zellen konnten jedoch nur im *Str. papillare* der Dermis, nicht jedoch in der Epidermis diagnostiziert werden. Ebenfalls konnte mittels RT- PCR in der cDNA von HaCaT- Zellen keine Expression von hCXCR6 nachgewiesen werden. Demnach handelt es sich hierbei um

eine räumliche Trennung zwischen dem Liganden (CXCL16) und dem Rezeptor (CXCR6) durch die Basalmembran. In der gesunden Dermis befinden sich normalerweise Fibroblasten, Endothelzellen, Nozizeptoren, Mastzellen, dendritische Zellen und T- Lymphozyten. In rheumatoiden Zellen, im peripheren Blut sowie in verschiedenen Zellgeweben, wie Peyer Plaques des Dünndarms oder im Leberparenchym, wurde auf Untergruppierungen der T-Lymphozyten und den natürlichen Killerzellen CXCR6 gefunden [9; 52; 99-100]. Des Weiteren konnte in intradermalen Immunzellen eine Gruppe CXCR6- exprimierender Zellen entdeckt werden. Durch die Immunhistologie konnte von Scholz et al. gezeigt werden, dass diese CXCR6- positiven Zellen der Dermis ebenfalls CD3 positiv, nicht jedoch alle CD3- exprimierenden Zellen CXCR6- positiv waren [77]. CXCR6 konnte in der Durchflusszytometrie auf isolierten T- Helfer- Zellen Typ 1 nachgewiesen werden [101], ebenfalls exprimieren die T- Zellen den CD- 3- Rezeptor. Demnach läßt sich vermuten, dass es sich hierbei um eine Untergruppe von T- Lymphozyten handelt, die in weiteren Studien genauer differenziert werden müsste [77].

Des Weiteren konnte von Scholz et al. gezeigt werden, dass proteolytisch freigesetztes CXCL16 biologisch aktiv ist. CXCR6- transfizierten HEK-293- Zellen wurde konzentrierter HaCaT- Überstand (Konzentration an CXCL16: 18ng/ml) hinzugegeben und für 30min inkubiert. In der Durchflusszytometrie ergab sich eine Herunterregulierung des CXCR6- Rezeptores im Vergleich zu unbehandelten CXCR6- transfizierten- HEK293- Zellen. Dieses spricht für ein Binden des Liganden CXCL16 an den Rezeptor CXCR6 [77].

Möglicherweise könnte dem CXCL16 Aufgaben bei der Lymphozytenrekrutierung in der Haut zugeordnet werden. Kommt es zu mechanischen Reizen (z.B. Verletzung der Epidermis) oder zu Stresssituationen (Sonnenbrand durch UV- Licht), könnte das zu einer Aktivierung von ADAM10 führen. Dieses wiederum sorgt für eine erhöhte Freisetzung an löslichem CXCL16 durch proteolytische Spaltung, das dann in die Dermis abgegeben werden könnte, um dort mit den CXCR6- positiven Zellen zu interagieren. Gleichzeitig stellt CXCL16 einen möglichen chemotaktischen Reiz für die Rekrutierung weiterer CXCR6- positiver Immunzellen, am ehesten der T- Zell-Untergruppe, dar. Möglicherweise werden die CXCR6- positiven Zellen auch in die lokal infizierte Region "gelockt", um dort den Heilungsprozess einzuleiten und als Schutz vor Mikroorganismen zu dienen. Gleichermaßen könnte das proteolytisch freigesetzte CXCL16 auch selbst als Schutz vor Mikroorganismen in der Epidermis fungie-

ren. Es kann angenommen werden, dass CXCL16- *Shedding* durch ADAM10 eine entscheidende Funktion in der CXCL16/CXCR6- Achse der Haut besitzt [77].



**Abb. 4.2. Schematische Darstellung der möglichen biologischen Relevanz des CXCL16 in der Haut.** CXCL16 wird von Keratinozyten in der Epidermis exprimiert, die es durch konstitutives ADAM10- *Shedding* abgeben. Mögliche Noxen für ein erhöhtes *Shedding* sind die UV- Bestrahlung in physiologischen Dosierungen und / oder mechanischer Stress [77]. Das lösliche CXCL16 kann zum Schutz vor Mikroorganismen als auch als chemotaktischer Reiz für CXCR6- positive Leukozyten in der Dermis dienen.

### 5. Zusammenfassung

CXCL16 ist ein Typ-I - transmembranes Chemokin, welches wie das CX3CL1 eine besondere Stellung in der Chemokinfamilie einnimmt, da es als lösliches und als transmembranes Chemokin existiert. Es wurde zuvor auf dendritischen Zellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, gingivalen Fibroblasten und Astrozyten beschrieben. In dieser Arbeit sollte das Vorkommen von CXCL16 in Keratinozyten der Haut und die proteolytische Regulierung durch Metalloproteinasen *in vitro* untersucht werden.

Mittels *Real- Time Polymerase Chain Reaction*, *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* und Durchflusszytometrie konnte die Expression und die Produktion von CXCL16 in der humanen HaCaT- und der murinen PAM212- Keratinozytenzelllinien in membranständiger und löslicher Form nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte mittels Immunhistologie hCXCL16 in der Epidermis, nicht aber in der Dermis gesunder Haut identifiziert werden.

Die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen Tumor- Nekrosefaktor  $\alpha$ , Interferon-  $\gamma$ , einer Kombination aus beiden sowie Interleukin- 4 zeigte keine Expressionserhöhung des hCXCL16 auf HaCaT- Zellen.

Es war bereits bekannt, dass unterschiedliche Metallproteinasen für die Regulation von Zytokinen auf Keratinozyten verantwortlich sind. Es bestand die Vermutung dass Proteasen der *A Disintegrin And Metalloproteinase* (ADAM) Familie hauptverantwortlich für die proteolytische Spaltung von CXCL16 in Keratinozyten sei. Mittels *Westernblot*- Analyse konnte die Expression von ADAM10 und ADAM17 gezeigt werden. Das Inhibitionsprofil der Inhibitoren GI254023X, GW280264X und Marimastat ergab, dass ADAM10 hauptverantwortlich für die proteolytische Spaltung von CXCL16 ist und dass ADAM17 keinen Einfluss hierauf zu haben scheint. Das CXCL16- *Shedding* konnte durch Ionomycinbehandlung verstärkt werden, welches wiederum durch ADAM10- Inhibition aufhebbar war. UV-B- Bestrahlung in physiologischen Dosierungen ergab ebenfalls ein erhöhtes ADAM10- abhängiges *Shedding*. Zusammengefasst zeigen diese Daten eine konstitutive Expression des CXCL16 in Keratinozyten und eine durch ADAM10 vermittelte Freisetzung von CXCL16, die durch Stimulation mit Ionomycin oder durch UV-B- Behandlung verstärkt wird. Das freigesetzte CXCL16 könnte dann in die Dermis abgegeben werden, um dort mit den CXCR6- positiven Zellen eine Interaktion einzugehen und somit eine von der CXCL16- Spaltung abhängige lokale Aktivierung von Immunzellen hervorrufen.



### 6. Literaturverweise

1. Löffler G, Petrides P (2003) Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
2. Jung EG, Moll I (2003) Dermatologie 5. Auflage, Georg Thieme Stuttgart
3. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR et al. (1992) Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J.Clin.Invest* 90:482-87
4. Wang XP, Schunck M, Kallen KJ, Neumann C, Trautwein C, Rose-John S, Proksch E et al. (2004) The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J.Invest Dermatol* 123:124-31.
5. Gillitzer R. and Goebeler M (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69:513-21
6. Homey B, Bunemann E (2004) Chemokines and inflammatory skin diseases. *Ernst Schering Res Found Workshop* 45:69–83
7. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B et al. (2000) Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 22:345–69
8. Payne AS and Cornelius LA. (2002) The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 118:915-22
9. Hase K, Murakami T, Takatsu H, Shimaoka T, Iimura M, Hamura K et al. (2006) The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT. *J Immunol* 176:43–51
10. Böckler W, Denk H, Heitz U (2004) Pathologie 3. Auflage, Elsevier GmbH, München
11. Silbernagl S, Despopoulos A (2001) Taschenatlas der Physiologie 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
12. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. et al. (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 243:1160-65
13. Gerard C and Rollins BJ (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2:108-15
14. Rollins B J. (1997) Chemokines. *Blood*. 90:909-28

15. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-27
16. Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-42
17. Rot A, von Andrian UH (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22:891-928
18. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, et al. (1997) Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387:611-7
19. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG et al. (2000) A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 1:298-304
20. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640-4
21. Yoshie O, Imai T, Nomiya H et al. (2001) Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78:57-110
22. Kim KS, Clark-Lewis I, Sykes BD et al. (1994) Solution structure of GRO/melanoma growth stimulatory activity determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem* 269:32909-15
23. Laurence JS, Blanpain C, Parmentier M, Burgner JW, LiWang PJ et al. (2000) The CC chemokine MIP-1b can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding. *Biochemistry* 39:3401-09
24. Paavola CD, Hemmerich S, Grunberger D, Polsky I, Bloom A, Freedman A, Mulkins D, Bhakta S, McCarley D, Wiesent L, Wong B, Jarnagin K, Handel TM et al. (1998) Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *J. Biol. Chem.* 273:33157-65
25. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-86
26. McCornack MA, Cassidy CK, LiWang PJ et al. (2003) The binding surface and affinity of monomeric and dimeric chemokine MIP-1b for various glycosaminoglycan disaccharides. *J. Biol. Chem.* 278:1946-56
27. Veldkamp CT, Peterson FC, Pelzek AJ, Volkman BF et al. (2005) The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) is altered by pH, phosphate, sulfate and heparin. *Protein Science.* 14:1071-81

28. Zerneck A, Weber C. (2005) Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol.* 100:93-101
29. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P et al. (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84
30. Murdoch C, Finn A (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95(10):3032-43
31. Spangrude GJ, Sacchi F, Hill HR, Van Epps DE, Daynes R A et al. (1985) Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol* 135:4135-43
32. Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T, Yonehara S et al. (2000) Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem* 275:40663-66
33. Zerneck A, Shagdarsuren E, Weber C et al. (2008) Chemokines in Atherosclerosis, an Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:0-0
34. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P et al. (2001) Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol* 166:5145–54
35. Tohyama M, Sayama K, Komatsuzawa H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tokumaru S, Nagai H, Hirakawa S, Sugai M, Hashimoto K et al. (2007) CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *International Immunology* 19(9):1095–102
36. Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N et al. (2004) The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrinlike metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* 172:6362–72
37. Hofnagel O, Luechtenborg B, Plenz G, Robenek H et al. (2002) Expression of the novel scavenger receptor SR-PSOX in cultured aortic smooth muscle cells and umbilical endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:710–1
38. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC et al. (1989) Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245:1238-1241
39. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA et al. (1990) Neutrophilactivating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med.* 171:1155-62
40. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T et al. (2007) CXC chemokine ligand 16 in periodontal diseases: expression in diseased tissues

- and production by cytokine-stimulated human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 149(1):146-54
41. Schramme A, Abdel-Bakky MS, Gutwein P, Obermüller N, Baer PC, Hauser IA, Ludwig A, Gauer S, Schäfer L, Sobbowiak E, Altevogt P, Koziolok M, Kiss E, Gröne HJ, Tikkanen R, Goren I, Radeke H, Pfeilschilfer J et al. (2008) Characterization of CXCL16 and ADAM10 in the normal and transplanted kidney. *Kidney International* 74:328-338
  42. Schramme A, Abdel-Bakky MS, Kämpfer-Kolb N, Pfeilschilfer J, Gutwein P et al. (2008) The role of CXCL16 and its processing metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 in the proliferation and migration of human mesangial cells. *J. bbrc370*:311-316
  43. Ludwig A, Schulte A, Schnack C, Hundhausen C, Reiss K, Brodway N et al. (2005b) Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. *J Neurochem* 93:1293–303
  44. Chandrasekar B, Mummidi S, Valente A J, Patel DN, Bailey SR, Freeman GL, Hatano M, Tokuhisa T, Jensen LE et al. (2005) The pro-atherogenic cytokine interleukin-18 induces CXCL16 expression in rat aortic smooth muscle cells via MyD88, interleukin-1 receptor-associated kinase, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, c Src, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, c-Jun N-terminal kinase, and activator protein-1 signaling. *J Biol Chem* 280:26263-77
  45. Minami M, Kume N, Shimaoka T, Kataoka H, Hayashida K, Yonehara S, Kita T et al. (2001) Expression of scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein (SR-PSOX) in human atheroma. *Ann N Y Acad Sci* 947:373-76
  46. Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wagsater D, Stemme V, Hedin U et al. (2004) CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:750–5
  47. Shimaoka T, Nakayama T, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S et al. (2003) Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol* 171:1647-51
  48. Shimaoka, T., Nakayama, T., Fukumoto, N., Kume, N., Takahashi, S., Yamaguchi, J., Minami, M., Hayashida, K., Kita, T., Ohsumi, J., Yoshie, O. and Yonehara, S. (2004) Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* 75, 267-274
  49. Ludwig A, Weber C et al. (2007) Transmembrane chemokines: Versatile “special agents “ in vascular inflammations. *Thromb Haemost.* 97(5):694-703. Review

50. Johnston B, Kim CH, Soler D et al. (2003) Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol* 171:2960-2969
51. Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Rychlewski M, Dempsey PJ, Raines EW et al. (2004) A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol* 172:3678-85
52. Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W et al. (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11:2615–24
53. Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O (2003) Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol* 170:1136–40
54. Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ et al. (2005) Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 3:e113
55. Schlondorff J, Blobel CP et al. (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci.* 112(Pt 21):3603-17
56. Moss ML, White JM, Lambert MH, Andrews RC et al. (2001) TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today.* 6:417-26
57. Bode W, Grams F, Reinemer P, et al. (1996) The metzincin-superfamily of zincpeptidases. *Adv Exp Med Biol.* 389:1-11
58. Killar L, White J, Black R, Peschon J. et al. (1999) Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Ann N Y Acad Sci.* 878:442-52
59. Chantry A, Gregson NA, Glynn P et al. (1989) A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 264:21603-07
60. Howard L, Lu X, Mitchell S, Griffiths S, Glynn P. et al. (1996) Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J.* 317(Pt 1):45-50
61. Nagano O, Murakami D, Hartmann D, de Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T et al. (2004) Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165:893–902

62. Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, De Strooper B, Grassi J, Lopez-Perez E, Checler F et al. (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, 276(41):37743-6
63. Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W et al. (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11:2615-24
64. Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ, Rosen-John et al. (2003) Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278(40):38829-39
65. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Srinivasan S, Nelson N, Bojani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP et al. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-33
66. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russel WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paton RJ, March CJ, Black RA et al. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282(5392):1281-4.
67. Tsakadze NL, Sithu SD, Sen U, English WR, Murphy G, D'Sousa SE et al. (2006) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem* 281(6):3157-64
68. Garton, KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, Dempsey PJ, Raines EW et al. (2003) Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem* 278(39):37459-64
69. Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Müllberg J et al. (2000) Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 267(9):2624-31
70. Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, Murphy G, Lemke H et al. (2000) CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 165(12):6703-9
71. Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Déchanet-Merville J et al. (2003) Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 278(35):32801-9

72. Nakamura H, Suenaga N, Taniwaki K, Matsuki H, Yonezawa K, Fujii M, Okada Y, Seiki M et al. (2004) Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 64(3):876-82
73. Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A et al. (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5(2):207-16
74. Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB, Bennett GL, Pittelkow MR, Coffey RJ, Ellingsworth L, Derynck KR, Voorhees JJ et al. (1989) Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* 243:811-14
75. Partsch G, Wagner E, Leeb BF, Dunky A, Steiner G, Smolen JS et al. (1998) Upregulation of cytokine receptors sTNF-R55, sTNF-R75, and sIL-2R in psoriatic arthritis synovial fluid. *J.Rheumatol* 25:105-10
76. Kawaguchi M, Mitsuhashi Y, Kondo S et al. (2004) Localization of tumour necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme in normal human skin. *Clin.Exp.Dermatol*, 29:185-87
77. Scholz F, Schulte A, Adamski F, Hundhausen C, Jens Mittag J, Schwarz A, Kruse ML, Proksch E, Ludwig A et al. (2007) Constitutive Expression and Regulated Release of the Transmembrane Chemokine CXCL16 in Human and Murine Skin. *J Invest Dermatol* 127(6):1444-55
78. Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K et al. (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102:1186-95
79. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD et al. (2005) Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:161-71
80. Musso DL, Andersen MW, Andrews RC, Austin R, Beaudet EJ, Becherer JD, Bubacz DG, Bickett DM, Chan JH, Conway JG, Cowan DJ, Gaul MD, Glennon KC, Hedeem KM, Lambert MH, Leesnitzer MA, McDougald DL, Mitchell JL, Moss ML, Rabinowitz MH, Rizzolio MC, Schaller LT, Stanford JB, Tippin T, Warner JR, Whitesell LG, Wieth RW et al. (2001) N-hydroxyformamide peptidomimetics as TACE/matrix metalloprotease inhibitors: oral activity via P1' isobutyl substitution. *Bioorg Med Chem Lett* 11:2147-51
81. Rabinowitz MH, Andrews RC, Becherer JD, Bickett DM, Bubacz DG, Conway JG, Cowan DJ, Gaul M, Glennon K, Lambert MH, Leesnitzer MA, McDougald DL, Moss ML, Musso DL, Rizzolio MC et al. (2001) Design of

- selective and soluble inhibitors of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE). *J Med Chem* 44, 4252-67
82. Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T et al. (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26:265-74
83. Suda K, Rothen-Rutishauser B, Gunthert M, Wunderli-Allenspach H et al. (2001) Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 37:505-14
84. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ et al. (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276:37993–8001
85. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J et al. (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164:769–79
86. Kaplan G, Luster AD, Hancock G, Cohn ZA et al. (1987) The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* 166:1098–108
87. Sugaya M, Nakamura K, Mitsui H, Takekoshi T, Saeki H, Tamaki K et al. (2003) Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1. *J Dermatol Sci* 31:179–87
88. Boorsma DM, Flier J, van den Brink EN, Sampat S, Walg HL, Willemze R, Tensen CP, Stoof TJ et al. (1999) IP-10 mRNA expression in cultured keratinocytes is suppressed by inhibition of protein kinase-C and tyrosine kinase and elevation of cAMP. *Cytokine* 11, 469-75
89. Hundhausen C, Schulte A, Schulz B, Andrzejewski MG, Schwarz N, von Hundelshausen P, Winter U, Paliga K, Reiss K, Saftig P, Weber C, Ludwig A et al. (2007) Regulated Shedding of Transmembrane Chemokines by the Disintegrin and Metalloproteinase 10 Facilitates Detachment of Adherent Leukocytes. *J Immunol.* 178(12):8064-72
90. Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D et al. (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24:742–52
91. Takasawa R, Nakamura H, Mori T, Tanuma S et al. (2005) Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis* 10:1121–30
92. Skiba B, Neill B, Piva TJ et al. (2005) Gene expression profiles of TNF- $\alpha$ , TACE, furin, IL-1 $\beta$  and matrilysin in UVA and UVB-irradiated HaCaT cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21:173–82



93. Tensen CP, Flier J, Van Der Raaij-Helmer EM, Sampat-Sardjoeipersad S, Van Der Schors RC, Leurs R et al. (1999) A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3). *J Invest Dermatol* 112:716–22
94. Fedyk ER, Jones D, Critchley HO, Phipps RP, Blieden TM, Springer TA (2001) Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing. *J Immunol* 166:5749–54
95. Nagano O, Murakami D, Hartmann D, de Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T et al. (2004) Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165:893–902
96. Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B et al. (2000) Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem* 275:20374–81
97. Ludwig A, Weber C et al. (2007) Transmembrane chemokines: Versatile “special agents “ in vascular inflammations. *Thromb Haemost.* 97(5):694-703. Review
98. Ruth JH, Haas CS, Park CC, Amin MA, Martinez RJ, Haines GK, Shahrara S, Campbell PL, Koch AE et al. (2006) CXCL16-Mediated Cell Recruitment to Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue and Murine Lymph Nodes Is Dependent Upon the MAPK Pathway *Arthritis & Rheumatism* 54(3):765–78
99. Sharron M, Pohlmann S, Price K, Lolis E, Tsang M, Kirchhoff F et al. (2000) Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes. *Blood* 96:41–9
100. van der Voort R, van Lieshout AW, Toonen LW, Sloetjes AW, van den Berg WB, Figdor CG et al. (2005) Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum* 52:1381–91
101. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK et al. (2006) The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 176:4431–9
102. Nestle FO, Meglio PD, Qin JZ, Nickoloff BJ et al. (2009) Skin immune sentinels in health and disease *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):679-91

## 7. Anhang

### 7.1. Rezepte

**Rezept 1:**

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)  
137mM Natriumchlorid (NaCl)  
027mM Kaliumchlorid (KCl)  
101mM Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
018mM Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  
in Aqua dest

**Rezept 3:**

*Wasching buffer*  
0,05% Tween2%  
in PBS

**Rezept 5:**

*Delution buffer*  
1% BSA  
in PBS

**Rezept 7:**

Trenngel (10%)  
2ml Aqua dest.  
1,25ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8  
1,7ml Acryl- /Bisacrylamid (30%/0,8% w/v)  
50 $\mu$ l 10% Natriumdodecylsulfatlösung  
25 $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfatlösung  
8 $\mu$ l N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

**Rezept 9:**

5x SDS-Probenpuffer  
3,5mM Natriumdodecylsulfat  
250mM Tris HCl pH 6,8  
5mM Dithiothreitol (DTT,  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ )  
0,7mM Bromphenolblau ( $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{O}_3\text{SNa}$ )  
50% Glycerol  
In Aqua dest.

**Rezept 11 :**

*Western Blot-Transferpuffer*  
25mM Tris  
190mM Glycin  
in Aqua dest.  
+20% Methanol

**Rezept 13:**

FACS-Puffer  
0,2% bovines Serumalbumin (BSA)  
1,5mM Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )  
in PBS

**Rezept 2:**

*coating buffer*  
1% BSA  
In PBS

**Rezept 4:**

*Blocking buffer:*  
BSA  
in PBS

**Rezept 6:**

Lysispuffer  
1% Triton-X  
1 Tablette Metalloprotease-Inhibitor Complete  
ad 50ml PBS

**Rezept 8:**

Sammelgel  
1,5ml Aqua dest.  
0,6ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8  
0,3ml Acryl- / Bisacrylamid (30%/0,8%w/v)  
10% Natriumdodecylsulfatlösung  
Start der Polymeration:  
12,5 $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfatlösung  
5 $\mu$ l N, N, N', N'-  
Tetramethylethylendiamin (TEMED)

**Rezept 10:**

SDS-Elektrodenpuffer  
25mM Tris ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )  
190mM Glycin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )  
3,5mM Natriumdodecylsulfat (SDS,  
 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{S}$ )  
In Aqua dest.

**Rezept 12:**

*Western Blot-Blockierpuffer*  
5% Milchpulver  
0,05% Tween  
in PBS

**Rezept 14:**

Fixierlösung  
4% Paraformaldehyd  
in FACS-Puffer

**Rezept 15:**

DEPC-Wasser  
Aqua bidest. mit 0,1% Diethylpyrocarbonat  
versetzt, für 12Std. bei 37°C inkubiert.  
Anschließend wurde das Wasser bei  
121 °C für 20min inkubiert.

**Rezept 16:**

7%ige Polyacrylamidgel für DNA und RNA  
7,4ml Wasser  
200µl TAE 50x  
2,3ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8% w/v)  
100µl 10% Ammoniumpersulfat  
10µl Temed

## 7.2. Geräte, Labormaterialien und Chemikalien

### 7.2.1. Geräte

96-well-Photometer: (SCT Rainbow) Tecan, Crailsheim  
Agarosegelelektrophoresekammer: (Mini Sub Cell GT) Bio-Rad, München  
Brutschrank (Zellkultur): Autoflow CO2 Water-Jacketed Incubator, USA  
Chemilumineszenzkamera: (LAS-1000) Fujifilm, Carrollton, USA  
Durchflusszytometer: (FACScan) Becton Dickinson, Heidelberg  
Durchflusszytometer:(FACS Canto) Becton Dickinson, Heidelberg  
Geldokumentationsanlage: Bio-Rad, München  
Mischer: Vortex Genie 2) Scientific Industries, New York, USA  
Multipipetten: Eppendorf, Hamburg  
Neubauer-Zählkammer: Roth, Nümbrecht  
Pipetten: Gilson, Middleton, USA  
Polyacrylamidgelelektrophoresekammer: (Mini Protean 3), Bio-Rad, München  
Semi-Dry-Blot Apparatur: (Trans-Blot SD) Bio-Rad, München  
Spannungsquelle: (Power Pac 200/300) Bio-Rad, München  
Spektrometer: (Ultraspec 3000) Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK  
Sterilarbeitsbank: (Hera safe) Heraeus, Hanau  
Thermocycler: (Personal Cycler) Biometra, Göttingen  
Ultraschallbad: (Sonorex RK 100 H) Bandelin, Berlin  
UV-Lampe: (FS20) Philips, Eindhoven, Holland  
Wasseraufbereitungsanlage: (Milli-Q Plus) Millipore, Billerica, USA  
Zentrifuge: (Biofuge 400e) Heraeus, Hanau  
Zentrifuge: (Biofuge pico) Heraeus, Hanau  
Zentrifuge: (Megafuge 2.0R) Heraeus, Hanau

### 7.2.2. Labormaterialien

Einwegkanülen: Braun, Melsung  
Eppendorfreaktionsgefäß (1,5/2mm): Sarstedt, Nümbrecht  
Mikrotiterplatte (ELISA): (Microton) Greiner, Frickenhausen  
Einwegspritzen:  
PCR Gefäße: Sarstedt, Nümbrecht  
Petrischalen (Zellkultur): Greiner, Frickenhausen  
Petrischalen (Zellkultur): Sarstedt, Nümbrecht  
Pipettenspitzen: Sarstedt, Nümbrecht  
PVDF-Membran: (Hybond-P) Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK  
Sterilfilter (Porengröße 0,2µm): Sarstedt, Nümbrecht  
6-well-Platte: Sarstedt, Nümbrecht  
10ml, 15ml und 50ml Plastikgefäße: Sarstedt, Nümbrecht  
24-well-Platte: Sarstedt, Nümbrecht

## 7.2.3. Verwendete Chemikalien

Acrylamid-/Bisacrylamidlösung: Roth, Karlsruhe  
Ammoniumchlorid: Roth, Karlsruhe  
Ammoniumpersulfat (APS): Merck, Darmstadt  
Ampicilin: Roth, Karlsruhe  
BM Blue POD Substrate: Roche, Basel, Schweiz  
Bovines Serum Albumin (BSA): ICN Biomedicals, Aurora, USA  
Chloroform: Roth, Karlsruhe  
Complete Proteaseinhibitor: Roche, Basel, Schweiz  
Cyanozimtsäure: Bruker, Bremen  
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP): Fermentas, St. Leon-Rot  
Diethylpyrocarbonat (DEPC): Sigma-Aldrich, Schnelldorf  
Dithiothreitol (DTT): Sigma-Aldrich, Schnelldorf  
DNA-Molekulargewichtsmarker (GeneRuler™) Fermentas, St. Leon-Rot  
Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM High Glucose): PAA, Cölbe  
ECL Plus Western Blotting Detection System: Amersham, Little Chalfont, UK  
Ethanol: Roth, Karlsruhe  
Ethidiumbromid: Roth, Karlsruhe  
Fetales Kälberserum (FCS): Gibco / Invitrogen, Karlsruhe  
Glycerin: Roth, Karlsruhe  
Guanidinhydrochlorid: Roch, Basel oder Degussa, Düsseldorf  
Humanes rekombinates CXCL16: R&D Systems, Minneapolis, USA  
Isopropanol: Roth, Karlsruhe  
Kaliumacetat: Merck, Darmstadt  
Kaliumchlorid: Merck, Darmstadt  
Kaliumhydrogenphosphat: Merck, Darmstadt  
Kaliumhydroxid: Merck, Darmstadt  
Kaliumphosphat: Merck, Darmstadt  
Kalziumchlorid: Merck, Darmstadt  
Magnesiumchlorid: Merck, Darmstadt  
Magnesiumsulfat: Merck, Darmstadt  
Methanol: Roth, Karlsruhe  
Milchpulver: Roth, Karlsruhe  
N, N, N', N'-Ethylendiamintetraacetat (EDTA): Sigma-Aldrich, Schnelldorf  
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED): Roth, Karlsruhe  
Natriumacetat: Merck, Darmstadt  
Natriumchlorid: Merck, Darmstadt  
Natriumhydroxid: Merck, Darmstadt  
Penicillin / Streptomycin (PEST): Invitrogen / Gibco, Karlsruhe  
Protein-Molekulargewichtsmarker (*Prestained Molecular Weight Marker*): Fermentas, St. Leon-Roth  
*Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640)-Medium: PAA Laboratories, Pasching, A  
Schwefelsäure: Sigma-Aldrich, Schnelldorf  
Sodiumdodecylsulfat (SDS): Roth, Karlsruhe  
Streptavidin-Sepharosesuspension: Amersham, Little Chalfont, UK  
Trichloressigsäure (TCA): Roth, Karlsruhe  
Trifluoressigsäure (TFA): Roche, Basel  
Tris-Base: Roth, Karlsruhe  
Tris-HCl: Roth, Karlsruhe; Tween 20: Roth, Karlsruhe

### 7.3. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Biochemie durchführen zu können.

Besonders danke ich Herrn Privatdozent Dr. Andreas Ludwig für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die hilfreichen und wichtigen Anregungen, Diskussionen und für die Betreuung der Doktorarbeit.

Danken möchte ich auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ludwig, in der ich mich immer wohl gefühlt habe. Besonders möchte ich Dr. Alexander Schulte und Dr. Christian Hundhausen erwähnen, die mir im Laufe meiner Arbeit immer zur Seite standen und mir viel über wissenschaftliches Arbeiten beigebracht haben.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Eberhard Proksch und seinem Mitarbeiter Dr. Felix Scholz aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie für die erfolgreiche Kooperation und die Hilfe bei vielen gemeinsamen Experimenten danken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mir während des ganzen Studiums, bei allen Höhen und Tiefen, zur Seite stand und mich mit ihrer ganzen Kraft unterstützt hat.

## 7.4. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum- und Ort	03. Mai 1981 in Itzehoe
Familienstand	ledig
Nationalität	Deutsch

### Akademischer Werdegang

Staatsexamen (Note 2)	Beginn 12. Februar 2009 Erfolgreich abgeschlossen am 03. Juli 2009
Zahnärztliche Vorprüfung in den Fächern (Note 2)	Physiologie, Biochemie und Zahnersatzkunde im Wintersemester 2004/2005 Anatomie im Sommersemester 2005
Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Note 3)	Sommersemester 2003
Eingeschrieben für das Fach Zahnmedizin im Sommersemester 2002 an der CAU Kiel	

### Doktorarbeit und Wissenschaftliche Mitarbeit

„Vorkommen und proteolytische Regulation von CXCL16 in der Haut“

Praktischer Teil	April 2005 – Januar 2007
Schriftlicher Teil	Januar 2007 – August 2009
Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Biochemischen Instituts der Medizinischen Fakultät der CAU Kiel	September 2005 – Oktober 2006

### Veröffentlichung:

Scholz F, Schulte A, **Adamski F**, Hundhausen C, Mittag J, Schwarz A, Kruse ML, Proksch E, Ludwig A et al. (2007) **Constitutive Expression and Regulated Release of the Transmembrane Chemokine CXCL16 in Human and Murine Skin.** *J Invest Dermatol* 127(6):1444-55

### Poster:

Scholz, A., Proksch, E., Schulte, A., **Adamski, F.**, Hundhausen, C., Schwarz, A., Ludwig, A. (2006) **“The membrane bound chemokine CXCL16 is constitutive expressed in keratinocytes and proteolytic cleaved by ADAM 10”** Poster auf der Tagung der SID in Philadelphia, Pennsylvania, USA

Schulte, A., Scholz, F. Hundhausen, C., **Adamski, F.** Neumann, C., Rose- John, S., Proksch, E., Ludwig, A. (2005) **“The transmembrane chemokine CXCL16 is expressed by keratinocytes and processed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10”** Poster auf dem “International Symposium on Inflammatory Diseases of Barrier Organs”, 3. + 4. Juni 2005, University Hospital of Kiel

### Grundwehrdienst

Freiherr – von – Fritsch - Kaserne,  
Breitenburg - Nordoe

Juli 2001 – März 2002

### Bildungsweg

Schulabschluss

Allgemeine Hochschulreife  
20. Juni 2001

Gymnasium

1998 - 2001 Fachgymnasium Itzehoe

Auslandsaufenthalt

Cooper – Highschool, Abilene, Texas,  
USA

Realschule

1991 – 1997 Realschule am  
Lehmwohl, Itzehoe

Grundschule

1987 – 1991 Grundschule  
Kremperheide

## 7.5. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Kiel, den .....

Unterschrift: \_\_\_\_\_

(Frederic Adamski)