

Anja Neßmann

Dr. med.

**Chemokin-Rezeptor-Modulation während der T-Zell-Aktivierung:
Untersuchung zur Funktion der GTPase Ras**

Fachgebiet: Immunologie

Doktormutter: Professor Dr. med. Yvonne Samstag

In dieser Arbeit wurde die Modulation der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR3, CCR7 und CCR5 bei der Aktivierung primärer humaner T-Zellen untersucht. Der Fokus der Versuche lag dabei auf den Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4, da diese beiden Rezeptoren eine bedeutende Rolle beim Homing der T-Zellen einnehmen. Ein Augenmerk wurde zudem auf die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 gelegt, die beide in der Lage sind, T-Zellen in entzündetes Gewebe zu dirigieren.

Um mehr über die Regulation der für die Chemokinrezeptor-Oberflächenexpression auf T-Zellen verantwortlichen Signalwege zu erfahren, wurden primäre humane T-Zellen mit Ionomycin, das das Kalzium-Signal fördert, und/ oder mit PMA, das die Proteinkinase C und die GTPase Ras aktiviert, behandelt. Interessanterweise konnte eine Verminderung der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR3, aber nur eine geringe beziehungsweise keine Veränderung der Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CCR7 und CCR5 beobachtet werden. Die Aktivierung der T-Zellen war anhand der erhöhten Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 ersichtlich.

Da sowohl im Rahmen der T-Zell-Aktivierung als auch durch die Proteinkinase C die GTPase Ras aktiviert wird, wurde die Rolle der Ras-Aktivierung bei der Regulation der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR3, CCR7 und CCR5 getrennt untersucht. Hierzu wurde konstitutiv aktives Ras (V12-Ras) in primäre humane T-Zellen eingebracht. Für den Chemokinrezeptor CXCR4 war im Vergleich zu den Kontrollzellen eine ebenfalls deutliche Erniedrigung der Oberflächenexpression feststellbar, wohingegen CXCR3

im Trend eine erhöhte Oberflächenexpression aufwies. CCR7 zeigte eine im Trend leicht verminderte Oberflächenexpression und CCR5 keine Veränderung.

Die Chemotaxis und Migration der primären humanen T-Zellen mit Expression von konstitutiv aktivem Ras war ebenfalls verändert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Chemotaxis dieser T-Zellen war in Richtung CXCL12, dem Chemokin für CXCR4, erniedrigt und in Richtung CXCL9, dem Chemokin für CXCR3, erhöht; was mit der veränderten Oberflächenexpression der entsprechenden Chemokinrezeptoren in T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ras korrelierte. Für Jurkat-T-Zellen, einer humanen T-Zell-Lymphomlinie, konnten ähnliche Effekte nach Transfektion mit V12-Ras bezüglich des Chemokinrezeptors CXCR4 und dem chemotaktischen Verhalten in Richtung CXCL12, dem zu CXCR4 zugehörigen Chemokin, beobachtet werden.

Außerdem wurde eine im Trend erhöhte Migrationsfähigkeit der T-Zellen mit V12-Ras auch bereits in Abwesenheit eines Chemokins beobachtet. Dies konnte mit Hilfe der Multispektralen Bild-Durchflusszytometrie (MIFC) auf eine erhöhte Polarisierung der T-Zellen mit konstitutiv aktivem Ras zurückgeführt werden.

Anschließend wurde untersucht, welche Ras nachgeschalteten Signalwege an der Regulation der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren beteiligt sind. Es wurde festgestellt, dass CXCR4, CCR7 und der Aktivierungsmarker CD69 über die Kinase MEK reguliert werden.

Da konstitutiv aktives V12-Ras nicht zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zelle führt, wurde untersucht, ob ein zusätzliches Signal eine volle Aktivierung zur Folge hat. Tatsächlich konnte für primäre humane T-Zellen, die V12-Ras exprimierten und mit Ionomycin behandelt wurden, eine vollständige Aktivierung erzielt werden, was anhand der deutlich gesteigerten Produktion der Zytokine Interleukin-2 und Interferon- γ sichtbar wurde.

Diese Kombination aus konstitutiv aktivem Ras und dem durch Ionomycin hervorgerufenen Kalzium-Signal hatte – wie vermutet - auch Auswirkungen auf die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren.

Darüber hinaus wurde die Veränderung des Chemokinrezeptorprofils auch im Zell-Zell-System analysiert. Nach Kontakt primärer humaner T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Raji-B-Zellen, einer humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie, für 6 Stunden waren tendenziell

ähnliche Effekte bezüglich der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR3 und CCR7 beobachtbar wie nach Behandlung mit Ionomycin und PMA.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sind wichtig für das Verständnis der Regulation der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren auf T-Zellen und haben möglicherweise Bedeutung für das migratorische Verhalten von Tumorzellen mit einer aktivierenden Ras-Mutation.