

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Vinzenz Hombach

**Induktion der Migration humaner CD4-positiver Lymphozyten
durch das Adipozytokin Resistin**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

Rebecca Berger

Berlin

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Marx

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schmitt

Tag der Promotion: 19.06.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung

1.1. Atherogenese	1
1.2. CD4-positive Lymphozyten	4
1.3. Migration CD4-positiver Lymphozyten	5
1.4. Resistin	6
1.5. Fragestellung	8

2 Material und Methoden

2.1 Material	9
2.1.1 Substanzen und Lösungen	9
2.1.2 Geräte und Kits	12
2.2 Methoden	13
2.2.1 Isolation CD4-positiver Lymphozyten	13
2.2.2 Migration CD4-positiver Lymphozyten	16
2.3 Zellvitalität	18
2.4 Reinheitsmessung nach Zellisolation	18
2.5 Western Blot Analysen	19
2.5.1 Stimulation der Zellen mit Resistin und Isolation zytosolischer Extrakte	19
2.5.2 Gelelektrophorese	20
2.5.3 Blotting	20
2.6 Statistik	21

3 Ergebnisse

3.1 Resistin induziert die Migration CD4-positiver Lymphozyten	22
3.2 Resistin wirkt chemotaktisch auf CD4-positive Lymphozyten	24
3.3 Intrazelluläre Signalwege	25
3.3.1 LY294002 hemmt die Resistin-induzierte Chemotaxis	25
3.3.2 Pertussistoxin hemmt die Resistin-induzierte Chemotaxis	26
3.3.3 CDTX und Exo C3 inhibieren die Resistin-induzierte Chemotaxis	27

3.3.4	SB20359 führt nicht zu einer Inhibition der Resistin-induzierten Chemotaxis	28
3.3.5	PD98059 führt nicht zu einer Inhibition der Resistin-induzierten Chemotaxis	29
3.3.6	Stimulation humaner CD4-positiver Lymphozyten mit Resistin führt zur Phosphorylierung von LIMK	30
3.3.7	Stimulation humaner CD4-positiver Lymphozyten mit Resistin führt zur Phosphorylierung von Cofilin	31
4	Diskussion	
4.1	Resistin wirkt chemotaktisch auf CD4-positive Lymphozyten	32
4.2	Intrazelluläre Signalwege	34
4.2.1	Pertussistoxin-sensitive G-Proteine	34
4.2.2	Phosphoinositol-3-Kinase	35
4.2.3	Rho - GTPasen	36
4.2.4	Mitogen-activated protein kinase	37
4.2.5	LIM-Kinase und Cofilin	39
4.3	Intrazelluläre Signaltransduktion	40
4.4	Bedeutung für die Atherogenese	41
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	43
7	Danksagung	50

Abkürzungsverzeichnis

ADSF	Adipocyte-specific secretory factor
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammonium Persulfate
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
Cdc42	Cell division cycle 42
CDTX	Clostridium difficile Toxin B
Co	Kontrolle
C-Peptid	Connecting peptide
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
Exo C3	Clostridium botulinum Exoenzym C3
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinthiocyanat
GCSF	Granulocyte colony stimulating factor
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
HDL	High density lipoprotein
HI	Hitzeinaktiviert
HRP	Horse radish peroxidase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1benzopyran-4-one hydrochloride
MACS	Magnetic cell sorting

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MEK1/2	eine MAPKK, die ERK1/2 phosphoryliert
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
Mio	Millionen
MMP	Matrixmetalloproteinasen
n	Fallzahl
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
p	Signifikanzniveau
PAK	P21-activated kinase
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PECAM	Platelet-endothelial cell adhesion molecule
PBS	Phosphate buffered saline
PD98059	2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran -4-one, Hemmstoff der MEK
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PS	Penicillin/Streptomycin
PtdIns-3,4-P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat
PtdIns-3,4,5-P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PTX	Pertussistoxin
Rac	Ras - related C3 botulinum toxin substrate
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (Chemokin)
RPM	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur

SB203590	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)- 5-(4-pyridyl)-1H-Imidazole
SDF	Stromal cell-derived factor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SVO	Sodium orthovanadat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline Tween 20
TNF	Tumor necrosis factor
TWEEN	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate
T-Zellen	CD4-positive Lymphozyten
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

I. Einleitung

1.1 Atherogenese

Gemäß der World Health Organization handelt es sich bei der Arteriosklerose um die „variable Kombination von Intimaveränderungen (der Arterien), bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen (Kalkablagerungen), verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“(10).

Zu den wichtigsten die Arteriosklerose begünstigenden Faktoren zählen die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Zigarettenkonsum. Darüberhinaus gelten auch Faktoren wie Adipositas, fehlende körperliche Aktivität, Stress, Erhöhung des Plasma-Homocysteins, infektiöses Geschehen und Hyperurikämie als Arteriosklerose-fördernd. Zuletzt existiert noch eine Gruppe unbeeinflussbarer Risikofaktoren, wie Lebensalter, Geschlecht und genetische Prädisposition.

Bei der Arteriosklerose handelt es sich um chronisch-entzündliche Gefäßveränderungen (48), deren Folgeerscheinungen wie Myokardinfarkt, cerebrale Ischämie und periphere arterielle Verschlusskrankheit zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in Europa, den USA und weiten Teilen Asiens gehören (9). Die Läsionen betreffen hauptsächlich die großen und mittelgroßen elastischen und muskulären Arterien (48).

Nach heutigen Erkenntnissen ist die Atherogenese ein inflammatorischer Prozeß, in dem immunologische Zellen wie Monozyten und T-Zellen, welche gehäuft innerhalb der Läsionen vorliegen (27), eine entscheidende Rolle spielen und deren frühestes Stadium bereits in großen fetalen Arterien gefunden werden kann (42). Granulozyten, als Hinweis auf ein akut-entzündliches Geschehen finden sich kaum innerhalb einer solchen Läsion (55).

Die frühe Atherogenese ist charakterisiert durch die so genannte endotheliale Dysfunktion, eine Störung der normalen Endothelfunktion. In dieser Phase, die der eigentlichen Läsionsentstehung vorausgeht, ist die Endothelpermeabilität gesteigert,

so dass Plasmabestandteile in die Gefäßwand insudieren können. In der Folge kommt es zur Aktivierung von Endothelzellen und Zellen des Subendothels mit konsekutiver Leukozytenrekrutierung und Einwanderung von Monozyten und CD4-positiven Lymphozyten in die Gefäßwand. Die Rekrutierung dieser Zellen beruht auf der Sekretion von Chemokinen und Expression von Adhäsionsmolekülen, wie vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1 und intercellular adhesion molecule (ICAM) 1 als Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und E-, sowie P-Selektin aus der Familie der Leukozyten-Rezeptoren, durch das geschädigte Endothel. Nach Migration in die Gefäßwand sezernieren die inflammatorischen Zellen hydrolytische Enzyme, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, was zu einer zusätzlichen Gewebsschädigung, Anlockung und Aktivierung weiterer inflammatorischer Zellen führt und zusammen mit der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, sowie der vermehrten Produktion fibrotischen Gewebes die weitere Plaquentstehung fördert.

Ursächlich für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion können freie Radikale verursacht durch Zigarettenkonsum, arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus, erhöhte Plasma-Homocystein-Konzentrationen oder ein infektiöses Geschehen, beispielsweise hervorgerufen durch Herpes-Viren oder Chlamydia pneumoniae (33), sein. Als maßgeblicher Faktor für die Schädigung des Endothels und der darunterliegenden glatten Gefäßmuskelzellen gilt auch unverändertes und oxidiertes, glykosyliertes, aggregiertes oder mit Proteoglykanen assoziiertes LDL (56). Diese werden in einem nächsten Schritt über scavenger receptors (24) von Makrophagen internalisiert, woraufhin diese sich zu Schaumzellen umwandeln und wiederum inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Interleukin-1 und macrophage colony stimulating factor (M-CSF), welcher an der weiteren Umwandlung von Monozyten zu Schaumzellen beteiligt ist (48), sezernieren. Es entstehen die sogenannten fatty streaks, in welchen sich neben den Schaumzellen hauptsächlich T-Lymphozyten finden. T-Lymphozyten, welche durch TNF- α , Interleukin-2 und GCSF angelockt und aktiviert werden, finden sich in allen Stadien der Atherogenese innerhalb der Läsion (22, 23), sie werden über von Makrophagen und glatten Muskelzellen präsentierte Antigene dazu angeregt Zytokine zu sezernieren, welche die inflammatorische Antwort amplifizieren (18), darunter

Interferon- γ und TNF- α , sowie Interleukin-2 (57).

Im Verlauf bildet sich eine fibröse Kappe. Diese Kappe überdeckt Leukozyten, Lipide und Zelldebris, der durch erhöhte proteolytische Aktivität, Zellapoptose und Lipidakkumulation den nekrotischen Kern bildet. Es entsteht eine fortgeschrittene komplizierte Plaque, die das Gefäßlumen teilweise obliteriert. Durch die ständige Einwanderung und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten, die matrixdegradierende Enzyme und Interferon- γ sezernieren dünnt die fibröse Kappe im weiteren Verlauf aus, die stabile Plaque geht in eine instabile Form über (34) und kann rupturieren oder ulzerieren, was durch Aktivierung der intravasalen Gerinnung zu einem kompletten Verschluss des Gefäßes führen kann. Das klinische Korrelat solcher Plaquerupturen stellt das akute Koronarsyndrom mit instabiler Angina pectoris oder akutem Myokardinfarkt (35), sowie die akute cerebrale Ischämie, beziehungsweise kritische Extremitätenischämie, dar.

In letzter Zeit wurde die Hypothese postuliert, dass es sich auch beim Fettgewebe um ein aktives endokrines Organ handelt, welches eine Reihe metabolisch wichtiger Substanzen, die Adipozytokine oder Adipokine, mit einer teilweise sehr potenten Wirkung auf die Pathogenese der Arteriosklerose, sezerniert. Es konnte gezeigt werden, dass das Adipokin Leptin mit einer deutlichen Verdickung der Arterienwand, einer verminderten Gefäßelastizität und einer Erhöhung proinflammatorischer Zytokine einhergeht. Darüberhinaus besitzt Leptin prokoagulatorische und antifibrinolytische Eigenschaften, wodurch es die Thrombus- und Atheromentstehung fördert. Insgesamt potenziert es das inflammatorische Geschehen innerhalb der Gefäßwand. Dagegen wird dem Adipokin Adiponektin eine vaskuloprotektive Wirkung zugeschrieben. Adiponektin inhibiert die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin, darüberhinaus hemmt es die Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen und mindert deren Phagozytose-Aktivität (30). Die proatherogene Wirkung des Adipokins Resistin ist Thema dieser Arbeit.

1.2 CD4-positive Lymphozyten

Thymusabhängige, oder kurz T-Lymphozyten stellen die primären Effektorzellen der zellulär vermittelten Immunabwehr dar. Durch auf ihrer Oberfläche lokalisierte Antigene, die Cluster of differentiation werden mehrere Subpopulationen unterschieden, so sind zwei Drittel CD4-positiv, ein Drittel CD8-positiv und noch etwa 5% exprimieren keines der beiden Oberflächenantigene. CD4-positive T-Zellen steuern als hauptsächlich regulatorisch wirkende Zellen die B- und T-Zellfunktion, sowie die der Monozyten durch Produktion von Zytokinen und direkten Zellkontakt. CD8-positive Zellen hingegen sind als zytotoxische Zellen in der Lage veränderte körpereigene oder dem Körper fremde Zellen zu lysieren (17).

Für die Atherogenese maßgeblich gilt die CD4-positive Subpopulation (27), diese kann in weitere drei Untergruppen unterteilt werden, von denen die T0-Zellen die ursprüngliche, den Selektionsprozeß im Thymus durchlaufende Form darstellt. Hiernach sind T0-Zellen in der Lage Antigene als körperfremd oder körpereigen zu erkennen. Sie differenzieren innerhalb der Gefäßwand zum großen Teil in inflammatorische Th1-Zellen und in weitaus geringerem Anteil in Th2-Helferzellen (18). Zunächst müssen jedoch Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und fragmentiert über den major histocompatibility complex (MHC) präsentiert werden. Erst auf diese Weise wird ein Erkennen über den T-Zell-Rezeptor möglich. CD4-positive T-Lymphozyten interagieren mit Klasse-II-MHC-Molekülen, während CD8-positive T-Lymphozyten mit Klasse-I-MHC-Molekülen interagieren und so an fast alle kernhaltigen Zellen binden können.

Inflammatorische Th1-Zellen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon- γ , TNF- α und Interleukin-2 (18, 23), was wiederum zur Progression der Arteriosklerose durch Induktion der Expression von major histocompatibility complex II (MHC II), sowie durch Endothelzell-Aktivierung und durch die Modulation der Immunantwort von Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen, beiträgt (18, 27, 36).

1.3 Migration CD4-positiver Lymphozyten

CD4-positive Lymphozyten besitzen die Fähigkeit entlang eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten zu migrieren, was ihnen wiederum ermöglicht, den Blutstrom zu verlassen und in verschiedene Gewebe einzudringen. Durch Kontakt mit einem entsprechenden Stimulus kommt es zu einem Strukturwandel der Zellen (51). Sie weisen dann eine polarisierte Struktur mit zwei spezifischen Zellkompartimenten auf, innerhalb dieser können sie entsprechend dem Stimulus Rezeptoren für Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Zytoskelettproteine umverteilen. Der führende Pol weist Chemokinrezeptoren, sowie die aus Aktin geflecht bestehenden Membranausstülpungen Lamellipodien und Filopodien, welche durch Aktinpolymerisation in ihrem Inneren für die Fortbewegung der Zelle sorgen, auf. Es folgen Zellkörper mit Zellkern und eine Endstruktur, die unter anderem Adhäsionsmoleküle enthält. Entscheidend für die Zellbeweglichkeit ist einerseits die gerichtete Aktinpolymerisation in Bewegungsrichtung und andererseits die Aktin-Myosin-Interaktion in Fibrillenbündeln (stress fibers), welche als kontraktile Zugseile durch die Zelle verlaufen und formgebende Elemente mit der Unterlage verspannen. Nach der Polarisierung der Zellen folgt die Protusion, wobei durch Aktinpolymerisation am sogenannten ‚leading edge‘ der Zelle Lamellipodien und Filopodien in Bewegungsrichtung verlängert werden. Es folgt die Adhäsion und Kontraktion, hierbei werden die Ausstülpungen durch neue Adhäsionspunkte an der Unterlage verankert, durch Myosin-vermittelte Kontraktion zieht sich die Zelle zusammen. Als letzter Schritt folgt die Substratablösung, durch Lösung der Adhäsionspunkte am hinteren Ende der Zelle bewegt sich diese fort.

Um den Blutstrom verlassen zu können, bedarf es mehrerer Schritte. CD4-positive Lymphozyten heften sich mithilfe einiger Adhäsionsmoleküle, wie L-Selektin, welches sich auf der Leukozytenoberfläche befindet, P-Selektin, auf Endothel und Thrombozyten und E-Selektin an das Endothel an, da diese Bindung jedoch instabil ist, rollen die Zellen, durch den Blutstrom getrieben, entlang der Gefäßwand. Für die nachhaltige Anheftung an die Gefäßwand mit der nachfolgenden Möglichkeit der Diapedese benötigen die Lymphozyten einen weiteren Rezeptor aus der Familie der Integrine, welcher im Gegensatz zu den Selektinen zunächst über unter anderem

von der Gefäßwand exprimierte Chemokine aktiviert werden muss.

Chemokine werden nach der Position ihrer Cysteingruppen in vier Untergruppen eingeteilt. Bei den α -Chemokinen werden zwei Cysteinsäuren von einer Aminosäure separiert, sie werden dementsprechend als CXC (C: Cystein, X: Aminosäure) bezeichnet und binden an CXCRs (R: Rezeptor). Eine weitere Gruppe, die β Chemokine bestehen aus zwei Cysteinsäuren, entsprechend CC, ihre Rezeptoren werden CCRs genannt. Die beiden weiteren Chemokin-Untergruppen heißen CX3C und XC, sie haben jeweils nur einen Rezeptor. Eine Vielzahl an Chemokinen führt, an den entsprechenden Rezeptor gebunden, zur Migration CD4-positiver Zellen. Einer dieser Chemokine ist das in dieser Arbeit verwendete SDF-1 α (stromal derived factor-1 α), dessen Rezeptor hauptsächlich auf Endothelzellen und T-Zellen exprimiert wird und zur Polarisierung der T-Zellen führt, welche im Verlauf die für die Migration entscheidende Morphologie annehmen.

Ebenfalls entscheidend für die Diapedese inflammatorischer Zellen sind ICAM (intercellular cell adhesion molecule), VCAM (vascular cell adhesion molecule) und PECAM (platelet-endothelial cell adhesion molecule) aus der Immunglobulin-Superfamilie. Alle drei werden von Endothelzellen exprimiert und binden an Integrine auf der Leukozytenoberfläche, wodurch diese befähigt werden, in ein Gewebe einzuwandern.

1.4 Resistin

Resistin, ein Peptidhormon, bestehend aus 108 Aminosäuren und 11 konservierten Cysteinen wurde 2001 von Steppan und Mitarbeitern entdeckt. Synonym wird es als FIZZ3 (found in inflammatory zone) und ADSF (adipocyte-specific secretory factor) bezeichnet. Steppan et alii konnten zeigen, dass Resistin, welches hauptsächlich von viszeralen Adipozyten gebildet wird, vermehrt in adipösen Mäusen zirkuliert und dort einen der Insulin-Wirkung entgegengesetzten Effekt ausübt (61), so dass es sich hierbei möglicherweise um ein Bindeglied zwischen Adipositas und Typ 2 Diabetes handelt. Dazu passend zeigten weitere Studien eine

signifikante Reduktion der Insulin-induzierten Glukose-Aufnahme in differenzierten Präadipozyten durch Resistin (39) sowie deutlich erhöhte Plasma-Resistin-Konzentrationen bei Patienten mit Metabolischem Syndrom (45).

Neben diesen metabolischen Effekten wird auch eine proatherogene Wirkung von Resistin postuliert (45). So zeigte sich *in vitro* ein aktivierender Effekt auf Endothelzellen mit konsekutiv vermehrter Expression von Endothelin-1 und Adhäsionsmolekülen (66), sowie eine Induktion der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (12). Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese generiert, dass Resistin direkt den Prozeß der Atherogenese fördert und zu dem ausgedehnten und diffusen Arteriosklerosemuster vor allem bei Patienten mit Diabetes mellitus und Insulinresistenz beiträgt.

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Resistin mit CD4-positiven Lymphozyten in arteriosklerotischen Plaques der A. carotis kolokalisiert. Über eine Beteiligung von Resistin an der für die Atherogenese entscheidenden Rekrutierung inflammatorischer Zellen war bis jetzt jedoch nichts bekannt.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde die Bedeutung von Resistin auf das Migrationsverhalten humaner CD4-positiver Lymphozyten untersucht.

Im Einzelnen ergibt sich somit folgende Fragestellung:

1. Induziert Resistin die Migration humaner CD4-positiver Lymphozyten?
2. Handelt es sich bei der Resistin-induzierten Zellmigration um Chemotaxis oder Chemokinese?
3. Welche Signaltransduktionswege sind für die Resistin-induzierte Zellmigration bedeutsam?

II. Material und Methodik

2.1 . Material

2.1.1 Substanzen und Lösungen

Acrylamid	Bio-Rad, USA
Anti-rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz, Biotechnologie, Inc.
Anti-phospho-cofilin-IgG (rabbit)	Cell Signaling Technologie, USA
Anti-phospho-limk-IgG (rabbit)	Santa Cruz Biotechnologie, Inc.
APS	1 g Ammonium Persulfate (Sigma)
	10 ml H ₂ O
Aqua bidest	Delta-Pharma, Germany
BCA	Pierce Technology USA
Bench Mark Protein Ladder	Invitrogen, life technologies
beta-Mercaptoethanol	Sigma Diagnostics, USA
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Austria
Bromphenolblau	Sigma Diagnostics, USA
Buffy Coat	Blutspendezentrale der Universität Ulm
Chemolumineszenzlösung	Pierce Technology, USA
CDTX	Sigma Diagnostics, USA
Glycerin	Sigma Diagnostics, USA
Glycin	Sigma Diagnostics, USA
Collagen I	100 µl Collagen
	50 µl
	1 N NaOH
	10 ml PBS
Collagen	Sigma Diagnostics, USA
C-Peptid	Sigma Diagnostic, USA
EDTA	Sigma Diagnostics, USA
Eosin	Dade Behring, Germany

Ethanol	Riedel-de Haen, Germany
Exoenzym C3	Calbiochem
Humanes Serum	PAA Laboratories GmbH, Austria
Hybridisierungssofen	Biometra, Germany
LIMK-Lyse-Puffer	5 ml LIMK 25 µl PMSF 25 µl SOV 25 µl Proteinaseinhibitor
Loading Buffer Western Blot	5 ml 0,5 M Trizma Base 4 ml Glycerol 0,8 g SDS 0,5 ml beta-Mercaptoethanol 25 mg Bromphenolblau 10 ml H ₂ O
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Austria
LY 294002	Calbiochem
Lymphozyten-Medium	RPMI 1640 0,5% humanes Serum 1% Streptomycin/Penicillin
MACS-Puffer	90 ml PBS 2 mM EDTA 10% humanes Serum 0,5% BSA
Methanol	Merck, Germany
PBS	PAA Laboratories, Austria
PBS + EDTA	500 ml PBS 2 ml 0,5 M EDTA
PBST	PBS 0,1% Tween 20
PD98059	Sigma Diagnostics, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Germany
Pertussistoxin	Sigma Diagnostics, USA

PMSF	Sigma Diagnostics, USA
Proteaseinhibitor	Sigma Diagnostics, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Austria
Resistin, Recombinant (Human)	Phoenix Pharmaceuticals
	30,3 g Trizma Base
	141 g Glycin
Running Buffer 10x Western Blot	10 g SDS
	1000 ml H ₂ O, pH: 8,3
Samplegel Western Blot	60 ml 30% iges Acrylamid
	45 ml 1,5 M Trizma Base
	1,8 ml 10% iges SDS
	71,04 ml H ₂ O
SB203590	Sigma Diagnostics, USA
SDF-1 α	Ustate Cell Signaling Solutions, USA
SDS	Roth, Germany
Stackgel Western Blot	15 ml 30% iges Acrylamid
	11,25 ml 1 M Trizma Base
	0,9 ml 10% iges SDS
SOV	Sigma Diagnostics, USA
TBS	24,2 g Tris Base
	80 g NaCl
	1000 ml H ₂ O, pH:7,6
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Thiazin	Dade Behring, Germany
Transferpuffer	Carl Roth GmbH & Co., Germany
Trizma Base	USB, USA
Tryranblau	Serva, Germany
Tween 20	Sigma Diagnostics, USA
Vitro-Clud (Eukitt)	Langenbrinck, Germany
Xylol	Merck, Germany

2.1.2 Geräte und Kits

Blot-Gerät	Bio-Rad, USA
Brutschrank „Hera Cell“	Heraeus Instruments
Boyden Chamber, modifiziert	Neuro Probe
Chromatographiepapier	Whatman, England
Deckplättchen	Marienfeld, Germany
Gelkammer Western Blot	Biometra, Germany
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf
Laminar Air Flow Bench „Hera Safe“	Heraeus Instruments
Leukosep Polypropylenröhrchen	Greiner bio-one, Germany
MACS CD4+ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, USA
MACS Separation Column	25 LS Columns Miltenyi Biotech, USA
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotech, USA
Mikroskop	Axioskop 2 plus, Zeiss
Neubauer-Zählkammer	Brand, Germany
Netzgerät	Biometra, Germany
Nucleopore Track-Etch Membrane	Whatman, England
Nylonfilter 30 µm	Miltenyi Biotech, USA
Nylonmembran Western Blot	Hybond, amersham pharmacia, UK
Objektträger	Glasbläserei Ulm, Germany
Pipetten	Gilson, France
Polypropylenröhrchen 15 ml/50 ml	FALCON Becton Dickinson, USA
Reagenzgläser	Greiner, Germany
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Safe Lock Eppendorf, Germany
Röntgenfilme	Hyperfilm, amersham pharmacia, UK
Röntgenkassetten	rego, Germany
Schwenkwinkelzentrifuge	Variofuge 3.0 R Heraeus, Germany
Thermocycler	Biometra, Germany
Zellkulturschalen 100 mm	FALCON Becton Dickinson, USA
Zellzähler	CASY 1, Schäfer System, Germany

2.2. Methodik

2.2.1 Isolation CD4-positiver Lymphozyten

Herkunft des Blutes

Für die Isolation CD4-positiver Lymphozyten wurden aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin, Gemeinnützige GmbH, der Universität Ulm stammende Buffy Coats verwendet. Hierbei handelt es sich um den hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten bestehenden Zellüberschuss, der bei der Gewinnung von Erythrozytenkonzentraten entsteht. Neuen Richtlinien entsprechend verblieben die Buffy Coats gekühlt über Nacht in der Blutspendezentrale und wurden am nächsten Morgen verarbeitet.

Isolation mononukleärer Zellen aus Buffy Coat

Vor Beginn der Isolation wurden zunächst das Lymphozyten-Separationsmedium, PBS und PBS + EDTA im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden in die Leucosep-Isolationröhrchen, welche mit einem Filter versehen sind 15 ml Leukozyten-Separationsmedium gefüllt. Nach einminütiger Zentrifugation mit 2300 rpm bei Raumtemperatur gelangte dieses unter die Filter-Scheibe.

Während oben genannter Zentrifugation wurde der Inhalt eines Buffy Coats mit PBS auf ein Volumen von 80 ml verdünnt, hiervon wurden im nächsten Schritt je 20 ml in die Leucosep-Röhrchen gegeben, so dass 4 Röhrchen mit jeweils unten 15 ml Leukozyten-Separationsmedium, gefolgt von einem Filter und oben je 20 ml mit PBS verdünntem Buffy Coat entstanden.

Es folgte nun eine Ficoll-Gradientenzentrifugation (2500 rpm, 14 Minuten, bei Raumtemperatur), so dass sich die verbliebenen Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten unter dem Filter ansammelten. Anschließend wurde das Serum, das die Schicht aus mononukleären Zellen überlagert, abgesaugt und die Interphasen der mononukleären Zellen in den Röhrchen vorsichtig abgenommen und in je ein

neues FALCON-Reaktionsgefäß, nun ohne Filter gegeben. Das abgesaugte Serum wurde in einem separaten Gefäß aufgefangen und später mit dem noch anfallendem Serum als infektiöser Müll entsorgt. Darauffolgend wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, RT). Nach der Zentrifugation fanden sich die Zellen als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes, darüber PBS mit Resten des noch verbliebenen Serums. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets mit 1 ml PBS + 2 mM EDTA resuspendiert und alle Zellen vom gleichen Spender in ein gemeinsames FALCON-Reaktionsgefäß überführt, welches erneut mit PBS + 2 mM EDTA auf 50 ml aufgefüllt wurde. Es folgte die erneute Zentrifugation (1200 rpm, 10 Minuten, RT). Das entstandene Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes mit 1 ml PBS + 2 mM EDTA resuspendiert und auf 10 ml aufgefüllt. Diese Zellsuspension wurde über einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 30 µm filtriert, um größere Partikel, welche später die Auftrennung durch Magnetmarkierung beeinträchtigen würden, zu entfernen. Die nun entstandene Suspension wurde gut gemischt, das Volumen genau bestimmt, 10 µl der Suspension entnommen, auf 10 ml NaCl aufgefüllt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Nach Multiplikation mit dem Gesamt-Volumen ergab sich die Gesamtzellzahl in der Suspension. Währenddessen wurde die übrige Suspension zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, RT).

In den sich anschließenden Schritten wurde die Suspension in ein Eis-Wasserbad gestellt um eine Temperatur von etwa 4-8 °C zu erhalten. Nach oben beschriebener Zentrifugation wurde wiederum der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in 40 µl kaltem MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Als nächstes wurden 10 µl des Biotin Antibody Cocktails, aus dem MACS CD4+ T cell Isolation Kit pro 10^7 Gesamtzellen hinzugefügt, die Suspension gut gemischt und für 10 Minuten bei 4-8 °C inkubiert. Im Anschluss wurden erneut 30 µl des MACS-Puffers und 20 µl der Anti-Biotin Micro-Beads pro 10^7 Zellen hinzugefügt und wiederum bei 4-8 °C für 15 Minuten inkubiert.

Anmerkung: Die biotinylierten Antikörper richten sich gegen nicht CD4-positive Zellen, indem sie an CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, T cell

receptor γ/δ und Glycophorin A binden und so z.B. CD8-positive Zellen, γ/δ T Zellen, Natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten markieren. Der zweite Antikörper ist gegen Biotin gerichtet und an eisentragende Micro Beads gekoppelt, so dass nicht-CD4-tragende Zellen magnetisch markiert werden, während CD4-positive Zellen unmarkiert bleiben.

Nach oben beschriebener 15-minütiger Inkubation wurde die Suspension mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt, gut gemischt und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Währenddessen wurde der MACS - Multi - Stand mit einer MACS - Separations - Säule ohne Stempel aufgebaut und ein Reagenzglas unter die Säule gestellt. Nachdem mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült wurde, wurde das Reagenzglas verworfen und durch ein neues ersetzt. Das nach der oben erwähnten Zentrifugation bestehende Pellet wurde mit 1000 μ l MACS-Puffer resuspendiert, bei einer Gesamtzellzahl unter 10^8 Zellen war auch ein Volumen von 500 μ l für die Resuspension ausreichend. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in die Säule gegeben, hiernach wurde dreimal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Es handelt sich bei der magnetischen Zellseparation um eine negative Selektion. Die durch die Antikörper magnetisch markierten nicht-CD4-positiven Zellen bleiben in der Säule haften, die CD4-positiven Zellen werden durch das nachfolgende Waschen wieder ausgespült. Zur Bestimmung der endgültigen Zahl CD4-positiver Lymphozyten wurden erneut 10 μ l abgenommen, auf 10 ml NaCl verdünnt und wie oben beschrieben ausgezählt. Durch Multiplikation mit dem Gesamtvolumen konnte die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Die erhaltene Zellsuspension mit CD4-positiven Lymphozyten wurde nachfolgend ein letztes Mal zentrifugiert (1000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Zellpellet im vorher auf 37 °C erwärmten Kulturmedium resuspendiert. Je 1 ml Kulturmedium, welches aus RPMI mit 0,5% humanem Serum und 1% Penicillin und Streptomycin bestand, wurde zu $1-2 \times 10^6$ Zellen gegeben. Die so hergestellte Suspension wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Migration CD4-positiver Lymphozyten

Für die Migration CD4-positiver Zellen wurde eine 48-well Boyden-Kammer verwendet, welche aus zwei Acrylplatten, einer Gummidichtung und 6 Schrauben besteht.

Während die Grundplatte 48 in Dreierreihen angeordneten Wells mit einem jeweiligen Volumen von 25 µl besitzt, enthalten sowohl die Oberplatte, als auch die Gummidichtung 48 durchgehende Löcher korrespondierend zu den 48 Vertiefungen der unteren Platte. Die Gummidichtung liegt dem Membranfilter auf. Dichtung und Filter werden zwischen oberer und unterer Acrylplatte platziert und mittels Schrauben zu einer Kammer verschlossen.

Es werden jeweils die 3 nebeneinander liegenden Löcher der Kammer mit denselben Lösungen befüllt, um den Versuch bei eventuell entstehenden Luftblasen dennoch verwerten zu können. Damit ergeben sich pro Kammer maximal 16 verschiedene Ansätze. Der Membranfilter besteht aus einer glatten und einer angerauten Seite, wobei letztere dem besseren Halt der Zellen dient und demnach unten liegt.

Zur Durchführung des Migrationversuches musste die 48-well Boyden-Kammer über Nacht im Brutschrank auf 37 °C vorgewärmt werden, etwa 6 Stunden vor Beginn des Migrationsversuches wurde der Filter für mindestens 4 Stunden in Collagen I gelegt, wobei auf eventuell entstandene Luftblasen geachtet wurde. Nachfolgend wurde der Filter für mindestens eine halbe Stunde zum Trocknen aufgehängt und hinterher für eine Stunde in serumfreiem RPMI bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, die sich über Nacht in ihrem Nährmedium im Brutschrank befanden, zentrifugiert (1300 rpm, 7 Minuten, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1ml RPMI, welches vorher auf 37 °C erwärmt wurde, resuspendiert und wiederum mit RPMI auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop wurde das Volumen mit RPMI so eingestellt, dass 5 Mio Zellen pro Milliliter RPMI vorlagen. Jeweils 500 µl der Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zu den Negativ- und Positivkontrollen wurden keine

weiteren Zusätze gegeben. Zu den restlichen 0,5 ml Zellsuspensionen wurden jeweils die gewünschten Inhibitoren im Verhältnis 1:1000, also 0,5 µl gegeben und gut gemischt. Diese Zellsuspensionen wurden für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. In dem darauffolgenden Schritt wurden die Vertiefungen der Grundplatte mit je 28,5 µl befüllt. Als Kontrolle diente das nicht chemotaktisch wirksame RPMI. Die chemotaktischen Substanzen, Resistin und als Positivkontrolle SDF-1 α , wurden mit RPMI auf 100 ng/ml verdünnt. Nach Befüllen der unteren Platte wurde der Filter mit der rauen Seite nach unten, sowie die Gummidichtung und die obere Deckplatte aufgelegt und mit Schrauben festgezogen. In die oberen Vertiefungen wurden je 45,5 µl der präinkubierten Zellsuspensionen pipettiert. Stets musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen, da sonst keine Migration stattfinden konnte. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. In dieser Zeit wanderten die Zellen entlang des chemotaktischen Gradienten nach unten durch den Filter hindurch und blieben an dessen rauer Seite haften.

Nach der dreistündigen Inkubationsphase wurde der Membranfilter aus der Kammer entnommen und angefärbt. Hierfür wurde er zunächst 10 Minuten in Methanol fixiert. Anschließend wurde der Filter 1,5 Minuten in Eosin und nachfolgend 3 Minuten in Thiazin angefärbt und zuletzt mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde der Filter auf einen Objektträger, welcher vorher mit Ethanol gereinigt wurde, mit der rauen Seite nach unten gelegt. Die glatte Seite mit den oben aufliegenden Zellen wurde abgewischt und mithilfe von Eukitt das Deckglas aufgeklebt.

Die migrierten Zellen stellten sich nun in den verschiedenen Kreisen dar, am nächsten Tag wurde jeweils einer der drei identischen Versuchsansätze ausgewertet. Dafür wurden 5 zufällige Gesichtsfelder mit einer 40fachen Vergrößerung betrachtet und ausgezählt.

2.3 Zellvitalität

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt auf das Migrationsverhalten nicht auf eine erhöhte Zelltodrate zurückzuführen ist, wurde ein Aliquot aus den Versuchsansätzen mit Trypanblau angefärbt. Dazu wurde zu 50 µl Zellsuspension 50 µl Trypanblau gegeben. Nach 30 Sekunden wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet und die Anzahl der vitalen an der Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Vitale Zellen erscheinen aufgrund der Fähigkeit durch die Zellmembran passierten Farbstoff wieder aus der Zelle zu transportieren hell. Bei fehlendem Stoffwechsel verbleibt der Farbstoff in toten Zellen, sie erscheinen somit blau.

2.4 Reinheitsmessung nach Zellisolation

Im Anschluss an die Zellisolation wurde mittels FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorter) die Reinheit der Zellsuspension bezüglich CD4-positiver Zellen gemessen. Dabei wurde ein Aliquot der isolierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 50 µl PBS sowie 5 µl Antikörper gegen CD3/CD4 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Der mit FITC markierte Antikörper bewirkt indirekt eine Fluoreszenz der CD4-exprimierenden Zellen.

Im nächsten Schritt wurde erneut gewaschen und die Zellen zur Fixation in 100 µl 1%-igem Formaldehyd resuspendiert. Die Messung der Zellen wurde in einem FACS-Durchflußzytometer durchgeführt. Zur Auswertung wurde jeweils der Prozentsatz CD4-positiver Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt, wobei sich die Stärke der CD4-Expression aus der Stärke der mittleren Fluoreszenz ergab.

Die FACS-Analyse zeigte für mehr als 95% der Zellen ein CD4-positives Signal.

2.5 Western Blot Analysen

Der Western Blot beschreibt eine Methode, mit der sich Proteine nach der Auftrennung gemäß ihres spezifischen Gewichtes mit Hilfe eines Antikörpers nachweisen lassen. Dies wurde durchgeführt, um weitere Elemente der Signalkaskade, die an der Migration humaner CD4-positiver Lymphozyten nach Stimulation mit Resistin beteiligt sind, auf Proteinebene in deren chronologischer Reihenfolge durch eine Zeitkinetik nachzuweisen.

Hierfür wurden wie oben beschrieben humane CD4-positive Lymphozyten aus einem Buffy Coat isoliert und in 6 well plates, etwa 5 Mio Zellen pro well, in RPMI mit 0,5% humanem Serum über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.1 Stimulation der Zellen mit Resistin und Isolation zytosolischer Extrakte

Zunächst erfolgte die Stimulation der CD4-positiven Zellen mit Resistin 100 ng/ml. Hierfür wurde vor dem Hintergrund einer Zeitkinetik in jedem well unterschiedlich lange mit Resistin stimuliert (10 Minuten, 5 Minuten, 3 Minuten und 1 Minute). Als Kontrollen dienten unstimulierte und für 3 Minuten mit 10 nM C-Peptid stimulierte Zellen.

Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis bei 4 °C. Um die Stimulation zum gewünschten Zeitpunkt zu stoppen wurden je 3 ml kaltes PBS in die Wells pipettiert, die Zellsuspension in FALCON Reaktionsgefäße überführt und nochmals 3 ml kaltes PBS je Bedingung zugefügt. Die, bei der nachfolgenden fünfminütigen Zentrifugation bei 1200 rpm entstandenen, Pellets wurden in je 300 µl LIMK-Lyse-Puffer resuspendiert und anschließend 15 Minuten inkubiert.

Die nun lysierten Zellen wurden im nächsten Schritt für 7 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, hiernach befanden sich die gewünschten Zell-Proteine im Überstand.

2.5.2 Gelelektrophorese

Um identische Proteinmengen in die Elektrophoresekammer laden zu können erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der zytosolischen Extrakte. Ein Viertel des nun vorhandenen Volumens wurde als Loading Buffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 100 °C für 10 Minuten erhitzt und kurz zentrifugiert. Das Erhitzen der Proteinproben führte zu einer Denaturierung und Reduzierung der Beschaffenheit der Proteinproben, die Zugabe des Puffers ein Coating der zuvor entfalteten Proteine und eine negative Ladung, die proportional zur Länge der Polypeptidketten war. Im nächsten Schritt wurden die Proben in das zuvor gegossene Polyacrylamidgel eingebracht. Hierbei handelte es sich um 15 ml eines 12% igen Samplegeles, welchem 150 µl APS (10%) und 30 µl TEMED gleichzeitig zugefügt wurden. In die Formen gefüllt war es nach 15 Minuten fest und konnte mit 5 ml 5% igem Stackgel, welches zuvor mit 10 µl TEMED und 50 µl APS (10%) gemischt wurde, überschichtet werden. Dieses Gel wurde nun mit 10 µl des Bench Mark Protein Ladder und in den folgenden Slots mit den Proben beladen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit Running-Buffer aufgefüllt und zuletzt die Spannung angelegt. Hierzu wurden 110 V für etwa 2,5 h angeschlossen.

2.5.3 Blotting

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels wet blotting auf eine Membran übertragen. Hierfür wurden zunächst die beiden Filter und das Gel für 20 Minuten in Transferpuffer eingelegt. Um die Nylonmembran zu aktivieren wurde diese für 10 Sekunden mit Methanol überschichtet und hinterher für 2 Minuten ebenfalls in Transferpuffer eingelegt. Anschließend konnte die Blotting-Kammer beladen werden, wobei darauf zu achten war, dass keine Luftblasen entstanden sind und die Membran an der positiv geladenen und das Gel entsprechend an der negativ geladenen Seite der Kammer angeordnet wurden. Durch die Anlage von 90 V wanderten die Proteine innerhalb 60 Minuten vom Gel

auf die Nylonmembran, welche nachdem sie getrocknet und im Anschluss mit Methanol aktiviert worden war, für eine Stunde in 5% iger Milch in TBST inkubiert wurde, um porenfreie Räume auf der Membran zu blocken. Nach einem kurzen Waschvorgang in TBST erfolgte die Zugabe des mit 5% igem BSA verdünnten p-cofilin-Antikörper (rabbit), beziehungsweise p-LIMK-Antikörper (rabbit) und Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Morgen wurde die Membran mindestens dreimal sorgfältig mit TBST gewaschen und anschließend mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-rabbit-IgG für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem sorgfältigem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die Antigendetektierung mit einer Chemolumineszenzlösung, in welche die Membran eingetaucht wurde und die durch die Meerrettich-Peroxidase aktiviert wurde, um dann gegen einen Röntgenfilm exponiert zu werden.

2.6 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als mean \pm standard error of the mean (SEM) dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels ONE-WAY ANOVA und nachfolgendem Duncan`s post-hoc-test untersucht. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

III. Ergebnisse

3.1 Resistin induziert die Migration CD4-positiver Lymphozyten *in vitro*

In einer modifizierten Boyden-Kammer wurde das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten untersucht. Es zeigte sich nach 3-stündiger Stimulation humaner CD4-positiver Lymphozyten (n = 6) mit Resistin eine konzentrationsabhängige Induktion der Zellmigration mit einer maximalen Induktion um das $2,2 \pm 0,5$ -fache der Kontrolle (unstimulierte Zellen) bei einer Konzentration von 100 ng/ml ($p < 0,05$).

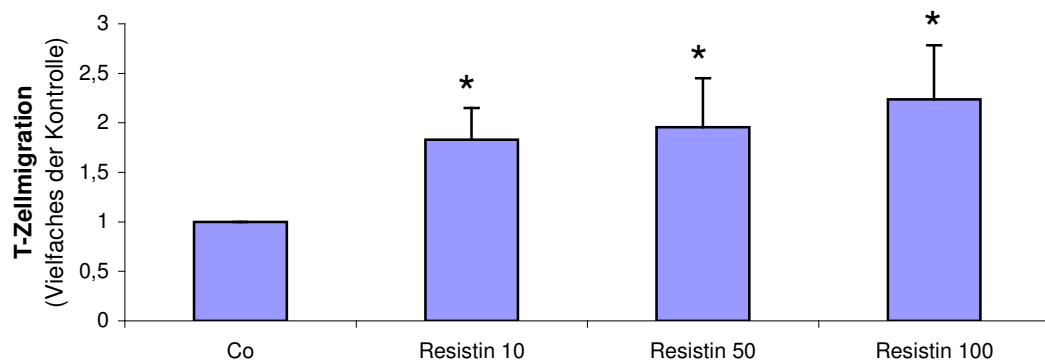


Abb. 1: Resistin induziert konzentrationsabhängig die Migration humaner CD4-positiver Zellen.

CD4-positive Lymphozyten wurden für 3 Stunden zusammen mit Resistin (10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) bei 37 °C in einer Boyden-Kammer inkubiert, wobei sich die CD4-positiven Lymphozyten in der oberen Kammer befanden und Resistin in der unteren Kammer. Anschließend wurde das Migrationsverhalten der Zellen untersucht. Es zeigte sich eine maximale Induktion der Zellmigration um das $2,2 \pm 0,5$ -fache der Kontrolle (unstimulierte Lymphozyten) bei 100 ng/ml. Co: Kontrolle.

CD: Cluster of differentiation.

* $p < 0,05$, die Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, n = 6.

Zum Ausschluss eines durch Endotoxinkontamination hervorgerufenen Effektes diente hitzeinaktiviertes Resistin als Kontrolle. Hierfür wurde Resistin mit einer Konzentration von 100 ng/ml für 15 Minuten bei 100 °C inkubiert. Das so vorbehandelte Resistin zeigte keinerlei Effekt auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Zellen ($p < 0,05$; $n = 3$).

Als Positiv-Kontrolle diente SDF-1 α , welches von zahlreichen Zellen und Gewebe produziert wird und sich ebenfalls in entzündlichem Gewebe findet, wo es hauptsächlich an Fibronectin bindet. Es handelt sich hierbei um ein potentes CXC Chemokin mit konzentrationsabhängigem Einfluss auf die Migration CD4-positiver Lymphozyten, B-Vorläuferzellen und Monozyten (6, 41), welche nach Stimulation mit SDF-1 α polarisieren und im Verlauf die für die Migration entscheidende Morphologie annehmen.

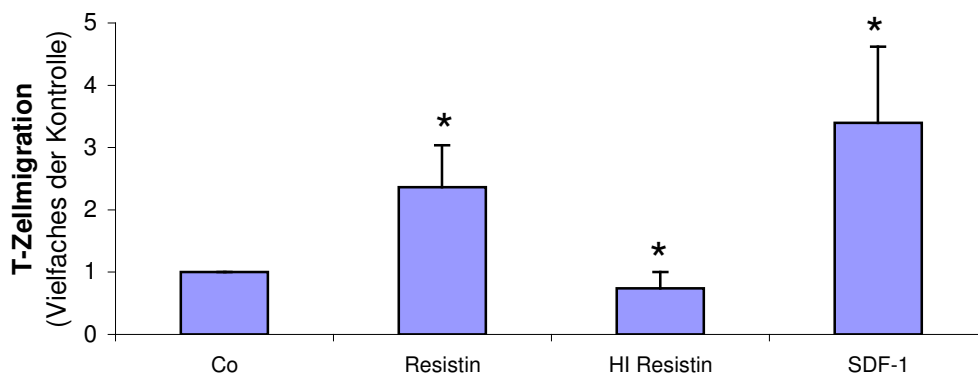


Abb. 2: Hitzeinaktiviertes Resistin (100 ng/ml) führt nicht zu einer Induktion der T-Zellmigration.

CD4-positive Lymphozyten wurden für 3 Stunden zusammen mit Resistin (100 ng/ml) und hitzeinaktiviertem Resistin (100 ng/ml) in einer Boyden-Kammer bei 37 °C inkubiert, wobei sich die CD4-positiven Lymphozyten in der oberen Kammer und Resistin und hitzeinaktiviertes Resistin in der unteren Kammer befanden. Anschließend wurde das Migrationsverhalten der Zellen untersucht. Es zeigte sich keine Induktion der T-Zellmigration über das Kontrollniveau (Co) hinaus.

CD: Cluster of differentiation.

SDF-1 α : Stromal-derived factor-1 α , CXC Chemokin.

HI Resistin: Hitzeinaktiviertes Resistin.

* $p < 0,05$, die Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$.

3.2 Resistin wirkt chemotaktisch auf humane CD4-positive Lymphozyten

Um zu zeigen, dass es sich bei der durch Resistin induzierten Migration CD4-positiver Lymphozyten um Chemotaxis, also die gerichtete Migration entlang eines Konzentrationsgradienten (13) und nicht um ungerichtete Chemokinese handelt wurden Checkerboard-Analysen durchgeführt (n = 3). Hierfür wurden ansteigende Konzentrationen von Resistin sowohl in die untere, als auch in die obere Kammer der Boyden-Kammer gegeben.

Die Checkerboard-Analysen zeigten, dass es bei gleichen Resistin-Konzentrationen oberhalb und unterhalb der Filtermembran zu keiner gesteigerten Zellmigration kommt, wohingegen ein Konzentrationsgradient mit erhöhter Resistin-Konzentration in der unteren Kammer zur Induktion der Migration CD4-positiver Zellen führt.

Somit handelt es sich hier nicht um Chemokinese, sondern um die gerichtete T4-Zellmigration entlang eines Konzentrationsgradienten.

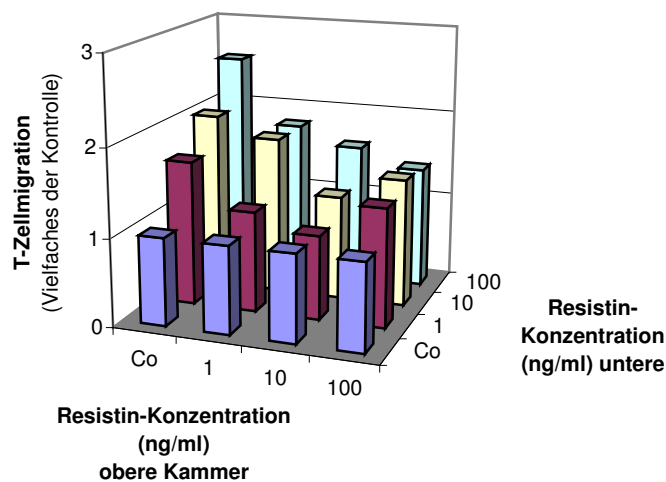


Abb. 3: Checkerboard-Analysen zeigen, dass es sich bei der Resistin-induzierten T-Zellmigration um Chemotaxis handelt.

CD4-positive Lymphozyten wurden für 3 Stunden zusammen mit Resistin bei 37 °C in einer Boyden-Kammer inkubiert, wobei sich sowohl in der oberen, als auch in der unteren Kammer ansteigende Konzentrationen von Resistin (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) befanden. Anschließend wurde das Migrationsverhalten der CD4-positiven Lymphozyten untersucht (n = 3). Hierbei handelte es sich um die gerichtete Migration entlang eines Konzentrationsgradienten, entsprechend Chemotaxis, und nicht um ungerichtete Chemokinese.

CD: Cluster of differentiation.

Co: Kontrolle.

3.3 Intrazelluläre Signalwege

3.3.1 LY294002 hemmt die Resistin-induzierte Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten

In der modifizierten Boyden-Kammer wurde die Beteiligung der PI3-Kinase an der durch Resistin induzierten Migration CD4-positiver Lymphozyten untersucht.

Humane CD4-positive Lymphozyten wurden nach Zugabe von LY, einem PI3-Kinase-Inhibitor, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Resistin-induzierten Migration ($p < 0,05$ für LY 5 μM , $n = 12$). Dieses Ergebnis legt nahe, dass PI3-Kinasen involviert sind.

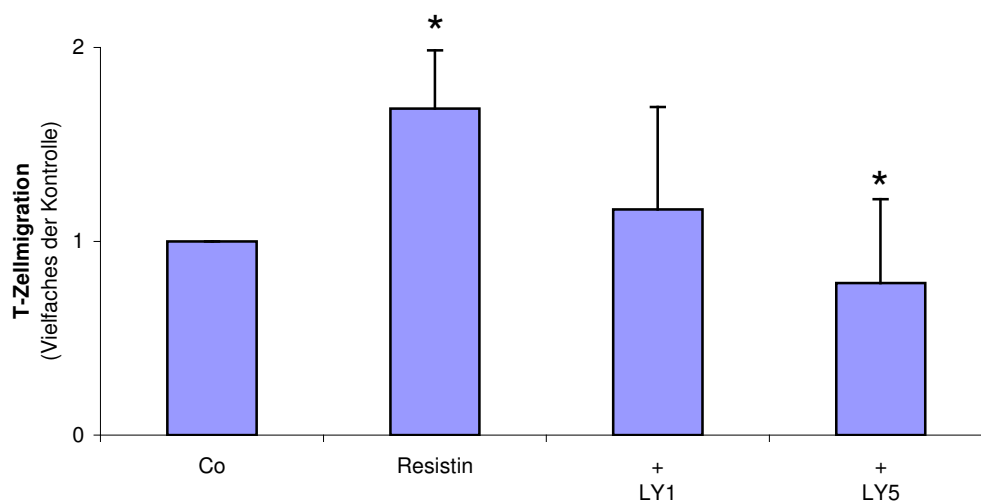


Abb. 4: LY wirkt konzentrationsabhängig inhibitorisch auf die Resistin-induzierte Migration humaner CD4-positiver Lymphozyten.

CD4-positive Lymphozyten wurden für 30 Minuten mit LY (1 μM und 5 μM) bei 37 °C vorbehandelt und anschließend zusammen mit Resistin (100 ng/ml) in einer Boyden-Kammer bei 37 °C inkubiert, wobei sich die CD4-positiven Lymphozyten in der oberen Kammer befanden und Resistin in der unteren Kammer. Nachfolgend wurde das Migrationsverhalten der Zellen untersucht. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der Resistin-induzierten Lymphozytenmigration durch den PI3-Kinase-Inhibitor LY.

LY1: 1 μM LY; LY5: 5 μM LY

CD: Cluster of differentiation.

Co: Kontrolle.

* $p < 0,05$, die Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 12$.

3.3.2 Pertussistoxin hemmt die Resistin-induzierte Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten

Um die Beteiligung Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine an der Migration CD4-positiver Lymphozyten zu untersuchen, wurden humane CD4-positive Lymphozyten für 30 Minuten bei 37 °C mit Pertussistoxin (10 µg/ml) inkubiert. Aufgrund einer deutlichen Inhibition der Zell-Migration nach Behandlung mit Pertussistoxin ($p < 0,05$, $n = 13$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kann von einer Beteiligung Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine an der für die Resistin-induzierte Chemotaxis relevanten Signalkaskade ausgegangen werden.

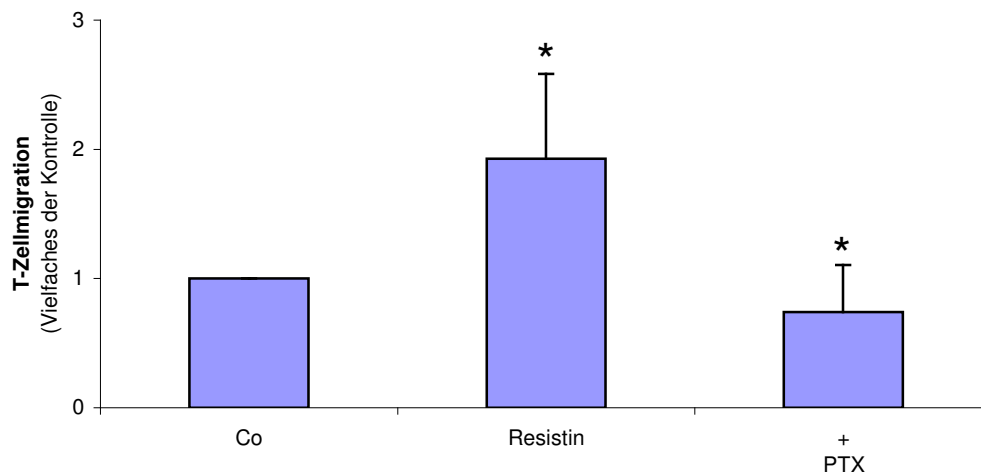


Abb. 5: PTX inhibiert die Resistin-induzierte Migration CD4-positiver Lymphozyten.

CD4-positive Lymphozyten wurden zunächst für 30 Minuten mit PTX (10 µg/ml) bei 37 °C vorbehandelt und anschließend zusammen mit Resistin (100 ng/ml) bei 37 °C in einer Boyden-Kammer inkubiert. Nachfolgend wurde das Migrationsverhalten der Zellen untersucht. Es zeigte sich eine Inhibition der Resistin-induzierten T-Zellmigration durch den Inhibitor Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine PTX.

CD: Cluster of differentiation.

Co: Kontrolle.

PTX: Pertussistoxin.

* $p < 0,05$, die Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 13$.

3.3.3 Clostridium difficile Toxin B und Clostridium botulinum Exoenzym C3 inhibieren die Resistin-induzierte Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten

Die Beteiligung kleiner GTPasen an der Resistin-induzierten Zellmigration konnte mit Hilfe des Clostridium difficile Toxin B (CDTX), welches alle Rho-GTPasen inhibiert und des Clostridium botulinum Exoenzym C3 (Exo C3), welches spezifisch RhoA inhibiert, nachgewiesen werden. Nach 30 minütiger Vorinkubation humaner CD4-positiver Lymphozyten mit CDTX und Exo C3 zeigte sich eine deutliche Inhibition der Resistin-induzierten Lymphozyten-Migration ($n = 7$, $p < 0,05$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dieses Resultat legt eine Beteiligung der kleinen Rho-GTPasen nahe.

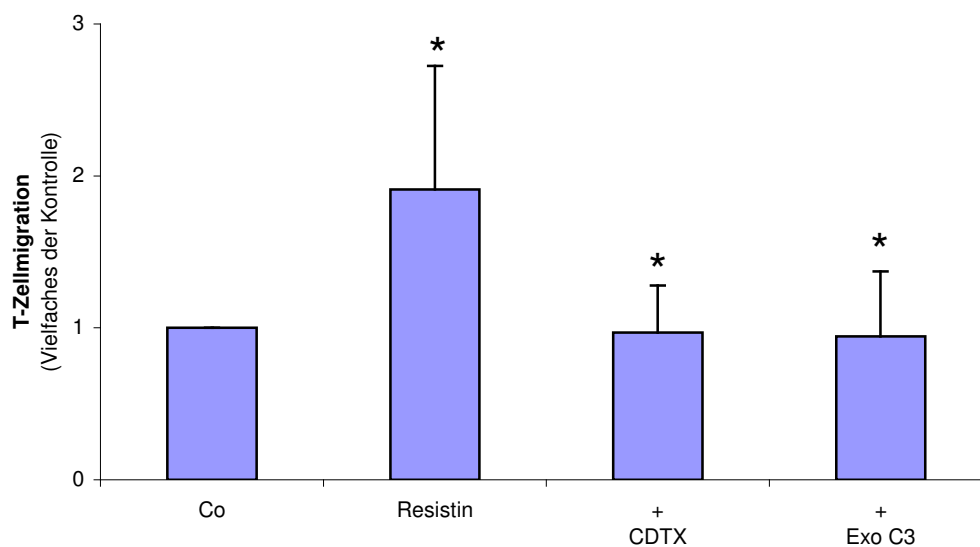


Abb. 6: CDTX und Exo C3 inhibieren die Resistin-induzierte Migration CD4-positiver Lymphozyten.

CD4-positive Lymphozyten wurden zunächst für 30 Minuten mit CDTX (50 $\mu\text{mol/l}$) und Exo C3 (25 $\mu\text{mol/l}$) bei 37 °C vorbehandelt und anschließend zusammen mit Resistin (100 ng/ml) bei 37 °C in einer Boyden-Kammer inkubiert, wobei sich die CD4-positiven Lymphozyten in der oberen Kammer befanden und Resistin in der unteren. Nachfolgend wurde das Migrationsverhalten der Zellen bestimmt. Es zeigte sich eine Inhibition der Resistin-induzierten T-Zellmigration durch die Inhibitoren kleiner Rho-GTPasen CDTX und Exo C3.

CDTX: Clostridium difficile Toxin B (50 $\mu\text{mol/l}$); Exo C3: Clostridium botulinum Exoenzym C3 (25 $\mu\text{mol/l}$).

CD: Cluster of differentiation.

Co: Kontrolle.

* $p < 0,05$, die Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 7$.

3.3.4 SB203590 führt nicht zu einer Inhibition der Resistin-induzierten Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten

Eine Beteiligung der p38-MAPK konnte durch 30 minütige Inkubation der T4-Lymphozyten bei 37 °C mit SB203590 (50 µmol/l und 100 µmol/l), einem Inhibitor der p38-MAPK ausgeschlossen werden. Es zeigte sich hiernach keine signifikant verminderte Migration der mit Resistin stimulierten Zellen ($p > 0,05$, $n = 9$).

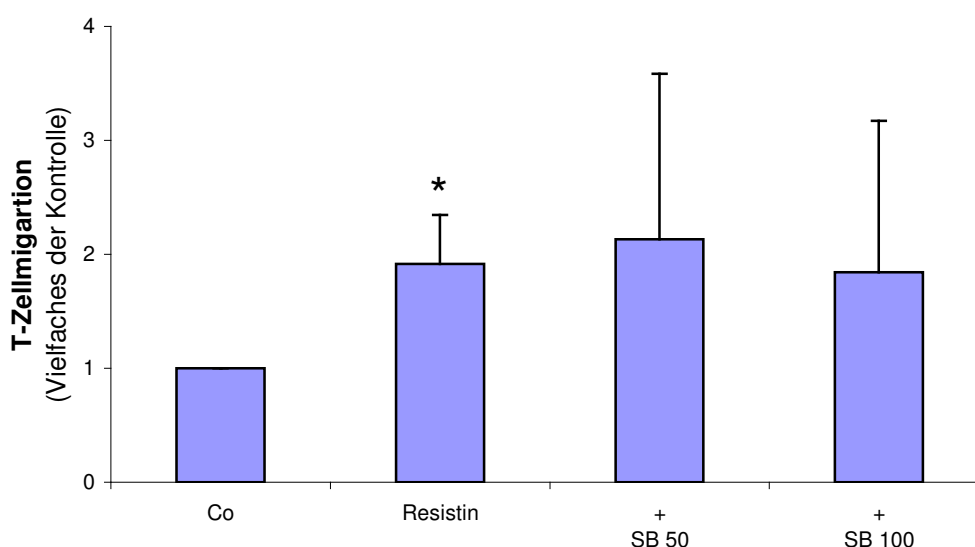


Abb. 7: SB203590 führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der Resistin-induzierten Migration humaner CD4-positiver Zellen.

CD4-positive Lymphozyten wurden zunächst mit SB203590 (50 µmol/l und 100 µmol/l) für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend zusammen mit Resistin in einer Boyden-Kammer bei 37 °C inkubiert, wobei sich die CD4-positiven Lymphozyten in der oberen Kammer befanden und Resistin in der unteren. Nachfolgend wurde das Migrationsverhalten der Zellen untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Inhibition der Resistin-induzierten T-Zellmigration durch den Inhibitor der p38-MAPK SB203590.

SB 50: 50 µmol/l SB203590; SB 100: 100 µmol/l SB203590.

CD: Cluster of differentiation.

Co. Kontrolle.

Die Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $p > 0,05$ für SB 50 µmol/l und SB 100 µmol/l, $n = 9$.

* $p < 0,05$.

3.3.5 PD98059 führt nicht zu einer Inhibition der Resistin-induzierten Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten

Die Zugabe von PD98059 (50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$), einem MEK1/2-Inhibitor zeigte gleichfalls keine signifikant verminderte Migration der mit Resistin stimulierten Lymphozyten ($p > 0,05$, $n = 8$), so dass auch MEK1/2 nicht an der intrazellulären Signalkaskade beteiligt zu sein scheint.

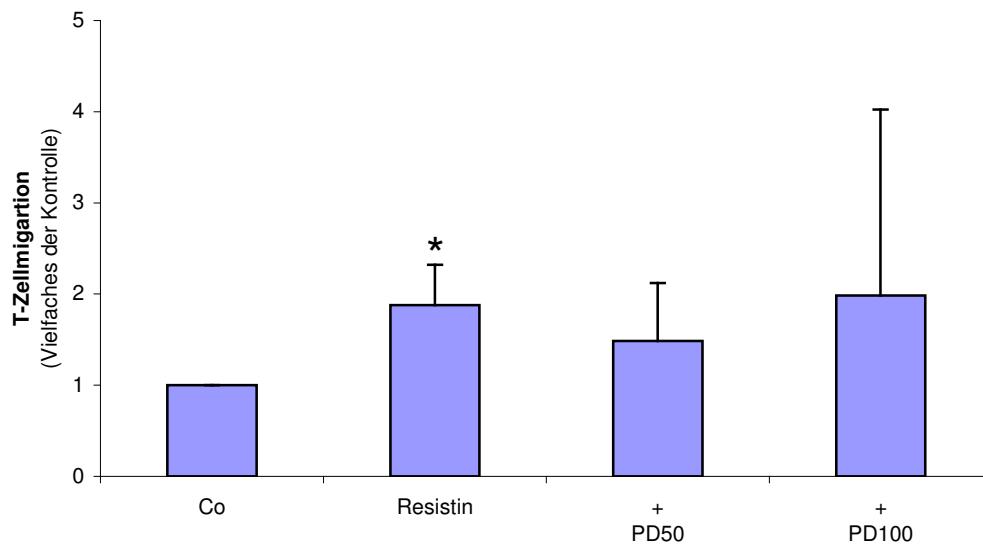


Abb. 8: PD98059 führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der Resistin-induzierten Migration CD4-positiver Lymphozyten.

CD4-positive Lymphozyten wurden zunächst mit PD98059 (50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$) für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend zusammen mit Resistin (100 ng/ml) für 3 Stunden bei 37 °C in einer Boyden-Kammer inkubiert, wobei sich die CD4-positiven Lymphozyten in der oberen Kammer befanden und Resistin in der unteren. Nachfolgend wurde das Migrationsverhalten der Zellen untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Inhibition der Resistin-induzierten T-Zellmigration durch den MEK1/2-Inhibitor PD98059.

PD 50: 50 $\mu\text{mol/l}$ PD98059; PD 100: 100 $\mu\text{mol/l}$ PD98059.

CD: Cluster of differentiation.

Co: Kontrolle.

Die Säulen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $p > 0,05$ für PD 50 $\mu\text{mol/l}$ und PD 100 $\mu\text{mol/l}$, $n = 8$.

* $p < 0,05$.

3.3.6 Stimulation humaner CD4-positiver Lymphozyten mit Resistin führt zur Phosphorylierung von LIMK

Die Serin/Threonin - Kinasen LIMK (LIM-domain-containing kinase), von denen zwei Isoformen, LIMK1 und LIMK2, existieren, regulieren die Aktinpolymerisation und sind darüber hinaus in die Mikrotubuli-Destabilisierung involviert, was einerseits zur Bildung von Aktinfasern führt und andererseits die Zellkontraktilität fördert. Zur Detektion der phosphorylierten und somit für die Migration relevanten Form von LIMK in den, mit Resistin stimulierten CD4-positiven Lymphozyten wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hier zeigte sich eine deutliche Zunahme von pLIMK (phosphorylierte LIM-Kinase) nach Stimulation mit Resistin mit einem Maximum zwischen 1 und 3 Minuten.

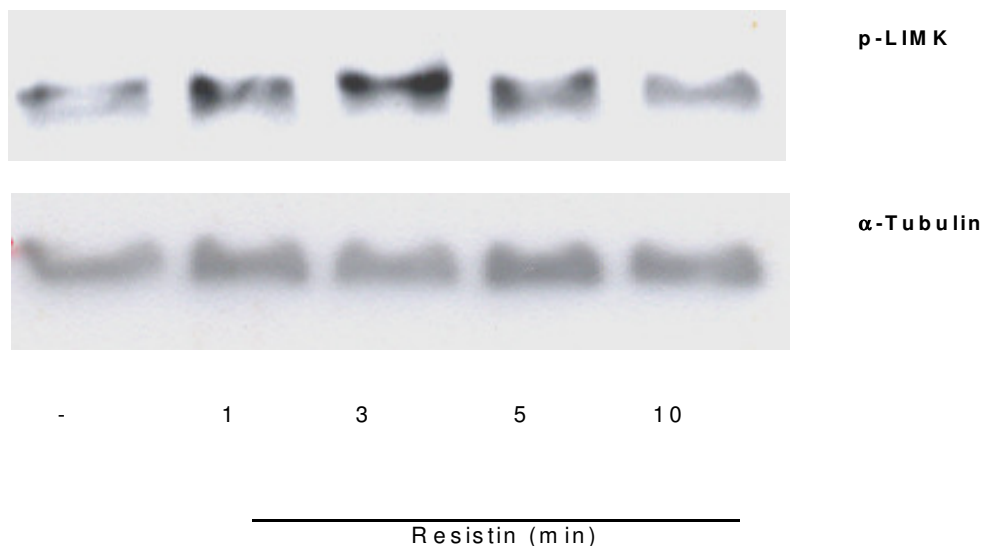


Abb. 9: Zunahme der Expression phosphorylierter LIM-Kinase in CD4-positiven Lymphozyten nach Stimulation mit Resistin.

Humane CD4-positive Lymphozyten wurden unterschiedlich lange (1 min, 3 min, 5 min, 10 min) mit Resistin stimuliert. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression phosphorylierter LIM-Kinase mit einem Maximum zwischen 1 und 3 Minuten im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Repräsentative Western Blot Analyse zur Expression phosphorylierter LIM-Kinase. Die Expression von α -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Drei unabhängige Experimente zeigten gleiche Ergebnisse.

3.3.7 Stimulation humaner CD4-positiver Lymphozyten mit Resistin führt zur Phosphorylierung von Cofilin

Cofilin, ein kleines (19 kDa) ubiquitär vorkommendes Protein, induziert einerseits die Aktindepolymerisation vom (-)-Ende der Aktinfilamente, wodurch neue Bausteine für die de novo Aktinpolymerisation in Bewegungsrichtung entstehen. Darüber hinaus induziert Cofilin die Fragmentierung von F-Aktin, um freie (+)-Enden für die weitere Aktinpolymerisation zu schaffen. Zur Detektion von phosphoryliertem Cofilin in den mit Resistin stimulierten Lymphozyten wurden Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen p-Cofilin durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme des intrazellulären p-Cofilin nach Stimulation mit Resistin mit einem Maximum zwischen 1 und 3 Minuten.

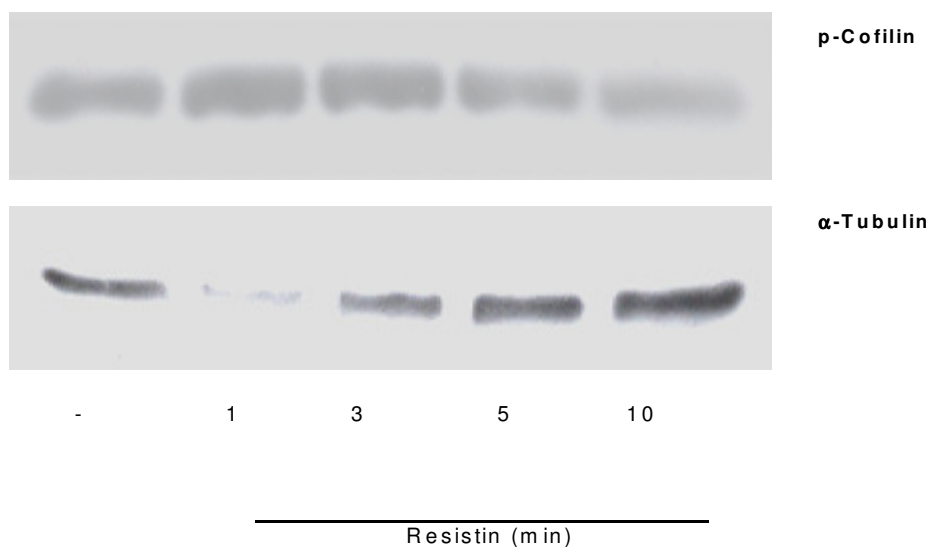


Abb. 10: Zunahme der Expression phosphorylierten Cofilins in CD4-positiven Lymphozyten nach Stimulation mit Resistin.

Humane CD4-positive Lymphozyten wurden unterschiedlich lange (1 min, 3 min, 5 min, 10 min) mit Resistin stimuliert. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression phosphorylierten Cofilins mit einem Maximum zwischen 1 und 3 Minuten. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Repräsentative Western Blot Analyse zur Expression phosphorylierten Cofilins Die Expression von α -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Drei unabhängige Experimente zeigten gleiche Ergebnisse.

IV. Diskussion

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Resistin *in vitro* konzentrationsabhängig chemotaktisch auf CD4-positive Lymphozyten wirkt und dieser Effekt vermutlich über Pertussistoxin-sensitive G-Proteine, PI3-Kinase, die kleinen Rho - GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42, sowie phosphorylierte LIM-Kinase und phosphoryliertes Cofilin vermittelt wird.

4.1 Resistin wirkt chemotaktisch auf CD4-positive Lymphozyten

Seit der Entdeckung des Resistin wurde diesem Adipozytokin primär ein metabolischer Effekt zugeschrieben. So weisen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, welcher durch Insulinresistenz der Zielzellen charakterisiert und eng mit Adipositas assoziiert ist, erhöhte Serum-Resistinkonzentrationen auf. Hier führt Resistin zu einer Potenzierung der Insulin-Resistenz, woher der Name dieses Peptids (*resistance to insulin*) stammt. Im Mausmodell zeigten sich nach Verabreichung eines anti-Resistin - Antikörpers verbesserte Blut-Glukosewerte und eine verbesserte Insulinresponsibilität bei Mäusen mit Adipositas, hervorgerufen durch übermäßige Kalorienzufuhr (60). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Resistin die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme in Adipozyten reduziert und Insulin selbst die Resistin-Sekretion durch Adipozyten fördert (39).

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 oder erhöhter Insulinresistenz und Adipositas stellen eine der Hochrisikopopulationen für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen mit ihren Folgen, dem akuten Myokardinfarkt und cerebralen Ischämien dar. In letzter Zeit wurde die Hypothese generiert, dass das bei diesen Patienten sehr ausgeprägt vorliegende viszerale Fettgewebe durch ein charakteristisches Zytokinexpressionsmuster, mit unter anderem dem pro-inflammatorisch wirkenden TNF- α oder dem vaskuloprotektiven Adiponektin, direkten Einfluss auf die Atherogenese besitzt. Dazu passend zeigten Verma et al. und Kawanami et al., dass Resistin über vermehrte Endothelin-1-Ausschüttung zu einer Endothelzell-Aktivierung führt, welche daraufhin vermehrt die für die

Leukozytenanheftung benötigten Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 exprimieren (66, 29). Darüberhinaus induziert Resistin die Endothelzellproliferation und deren Migration und führt zu einer signifikanten Hochregulation der mRNA-Expression von vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR-1 und VEGFR-2) und Metalloproteinasen (MMP-1 und MMP-2) (40). Calabro und Mitarbeiter zeigten weiterhin, dass Resistin die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen induziert (12).

Über einen möglichen Einfluss von Resistin auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten war bis jetzt noch nichts bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Resistin *in vitro* konzentrationsabhängig, mit einem Maximum bei 100 ng/ml, chemotaktisch auf CD4-positive Lymphozyten wirkt.

Kritisch zu betrachten ist die Tatsache, dass die in dieser Arbeit verwendeten Resistin-Konzentrationen (100 ng/ml) die physiologischen Resistin-Konzentrationen, welche etwa bei 7-9 ng/ml liegen (25,32), weit überschreiten. Diese Konzentrationen beziehen sich jedoch auf gesunde Probanden. Studien aus China zeigten, dass die Serum-Resistinkonzentrationen bei Patienten mit Angina pectoris im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe von durchschnittlich 8,71 ng/ml auf 10 ng/ml bei stabiler Angina pectoris und 12,09 ng/ml bei instabiler Angina pectoris erhöht waren (25). Darüber hinaus konnten Jung et al. nachweisen, dass Resistin innerhalb atherosklerotischer Läsionen von Makrophagen sezerniert wird (28), so dass lokal höhere Resistin-Konzentrationen erreicht werden. Ferner hängt die Resistin-induzierte Lymphozyten-Chemotaxis von einem Konzentrationsgradienten zwischen Blut und subendothelialelem Raum, dessen Resistin-Konzentration nicht bekannt ist, ab, so dass sich die eingesetzten Konzentrationen möglicherweise der *in vivo* relevanten Konzentration annähern.

Typischerweise finden sich bei adipösen Patienten und solchen mit Insulinresistenz und frühem Diabetes mellitus Typ 2 neben den beschriebenen erhöhten Konzentrationen zirkulierenden Resistins häufig auch eine endotheliale Dysfunktion mit gesteigerter Endothelpermeabilität, sodass sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit und früherer Studien die Hypothese aufstellen lässt, dass Resistin möglicherweise bei Patienten mit gesteigerter Endothelpermeabilität in die

Gefäßwand insudiert, auf jeden Fall aber innerhalb einer frühen Läsion von Makrophagen sezerniert wird, sich in der Arterien-Intima anreichert und chemotaktisch auf inflammatorische Zellen, in diesem Fall CD4-positive Lymphozyten, wirkt und so die Migration dieser Zellen in die Gefäßwand, was wiederum einen entscheidenden Schritt in der Atherogenese darstellt, induziert und potenziert.

4.2 Intrazelluläre Signalwege

4.2.1 Pertussistoxin-sensitive G-Proteine

Die Inkubation CD4-positiver Lymphozyten mit PTX zeigte eine signifikante Inhibition der Resistin-induzierten Chemotaxis. PTX ist ein Hemmstoff an Zellmembranrezeptoren gekoppelter heterotrimerer G-Proteine (guanine nucleotide binding proteins). G-Proteine besitzen eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und second-messenger-Systemen. Heterotrimere G-Proteine sind aus drei Untereinheiten aufgebaut, die zwei Gruppen bilden, α und β/γ , wobei die α -Untereinheit eine GDP/GTP-Bindungsstelle besitzt. Nach Austausch von GDP gegen GTP durch einen guanine nucleotide exchange factor (GEF) dissoziieren die Bestandteile und liegen in ihrer aktiven Form vor. Man kennt heute mehr als 20 Isoformen heterotrimerer G-Proteine, von denen unter anderem die α_{12} und α_{13} Untereinheiten der G-Proteine $G_{12/13}$ über eine Aktivierung von Rho-GTPasen an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind (21).

Pertussistoxin-sensitive G-Proteine sind an vielfältigen Signalkaskaden in Lymphozyten beteiligt. So stimuliert das ebenfalls pro-inflammatorisch wirksame C-Peptid, ein Spaltprodukt des Proinsulins, die Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten konzentrationsabhängig über Pertussistoxin-sensitive G-Proteine (68). Auch die Interleukin-8 induzierte Lymphozytenmigration involviert Pertussistoxin-sensitive G-Proteine (5), ebenso die stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)- induzierte Zellmigration (63), welche in unseren Migrationsversuchen als Positiv-Kontrolle diente.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass Resistin durch Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor zur Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten führt.

4.2.2 Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)

Durch Zugabe des Phosphoinositol-3-Kinase Hemmstoffes LY294002 konnte konzentrationsabhängig eine signifikante Reduktion der Resistin-induzierten T-Zell-Chemotaxis erreicht werden.

Die Signaltransduktionsmoleküle PI3K sind an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Überleben, Adhäsion und Migration beteiligt und können über verschiedenste Stimuli-Zytokine, Immunglobuline und Chemokine- aktiviert werden. Sie besitzen eine Lipidkinaseaktivität, die zur Akkumulation von Lipidprodukten in der Zellmembran führt, sowie eine Proteinkinaseaktivität, die eine Phosphorylierung weiterer Signalmoleküle bewirkt.

PI3-Kinasen können in 3 Hauptgruppen eingeteilt werden. Klasse I PI3K, welche in IA und IB eingeteilt werden phosphorylieren PtdIns, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂, darüberhinaus interagieren sie mit Ras und heterodimeren Komplexen, die zu unterschiedlichen Signalwegen führen. Sie bestehen aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit, von denen verschiedene Isoformen existieren, die Klasse IA besteht unter anderem aus den regulatorischen/Adapter-Einheiten p85 α/β , p55 γ und unter anderem den katalytischen Einheiten p110 $\alpha/\beta/\gamma$. Die Klasse IB PI3K (PI3K γ) wird über die β/γ -Untereinheit von G-Proteinen aktiviert (65, 58, 59) und ist mit einer p101 Adapter-Einheit assoziiert.

Klasse II PI3K (u.a. PI3K-C2 $\alpha/\beta/\gamma$) sind durch eine C2 Domäne charakterisiert und phosphorylieren hauptsächlich PtdIns und PtdIns(4)P. Klasse III PI3K phosphorylieren vornehmlich PtdIns.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass den Phosphoinositol-3-Kinasen eine zentrale Rolle in der Chemotaxis inflammatorischer Zellen, wie Eosinophilen, Makrophagen, Neutrophilen und vor allem CD4-positiven Lymphozyten obliegt

(46, 53, 69). Sotosis und Mitarbeiter wiesen nach, dass das in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendete CXC Chemokin SDF-1 α über eine Aktivierung der PI3K mit nachfolgender intrazellulärer Akkumulation von PtdIns(3,4,5)P₃ zur Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten führt (54). Passend zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche einen G-Protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptor vermuten, führt ein weiterer Schritt in der Resistin-induzierten Chemotaxis CD4-positiver Zellen möglicherweise nach Aktivierung Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine zu einer Beteiligung der G β/γ -abhängigen PI3K γ . Zur genauen Differenzierung der beteiligten PI3K könnte in nachfolgenden Studien deren phosphoryliertes Produkt nach Stimulation der Zellen mit dem entsprechenden Chemokin quantifiziert werden. Weitere Studien legen darüberhinaus die Vermutung nahe, dass nicht ausschließlich PI3K γ an der Chemokin-induzierten Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten beteiligt ist, sondern auch andere Isoformen, unter anderem das p85/p110 Heterodimer (54, 64).

4.2.3 Rho - GTPasen

Durch die Zugabe der Rho - GTPasen Hemmstoffe CDTX und ExoC3 konnte ebenfalls eine signifikante Hemmung der Resistin-induzierten Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten erreicht werden.

Rho GTPasen gehören zur RAS - Superfamilie kleiner monomerer G-Proteine (guanine nucleotide binding proteins). Über GEFs (guanine nucleotide exchange factors) werden sie von ihrer inaktiven GDP-gebundenen Konformation in eine aktive GTP-gebundene überführt. Die drei bekanntesten Mitglieder der Rho GTPasen, RhoA, Rac1, Cdc42 nehmen eine Schlüsselposition als Regulatoren des Aktinzytoskeletts ein (44, 47, 11). In migrierenden Zellen reguliert RhoA die Formation der stress fibers, fokaler Adhäsionskomplexe und der kontraktilen Aktin-/Myosinfilamente, während Rac1 und Cdc42 die Aktinpolymerisation für die Formation von Lamellipodien und Filopodien reguliert (49, 62). Darüber hinaus sind sie an der Regulation des Zellwachstum, intrazellulärem Transport und der Zellapoptose beteiligt (50).

Das einkettige Clostridium botulinum Exoenzym C3 ADP-ribosyliert spezifisch RhoA (B und C) (67), während das Clostridium difficile Toxin B RhoA ebenso wie Rac und Cdc42 glucosyliert und damit inaktiviert (26).

Bereits in zurückliegenden Studien konnte die Beteiligung kleiner GTPasen der Rho Familie für die Regulation wichtiger immunologischer Funktionen von B- und T-Lymphozyten, sowie dendritischen Zellen aufgezeigt werden (50). Weitere Arbeiten demonstrierten, dass Rho GTPasen wichtige Komponenten innerhalb des Signalweges der Aktivierung CD4-positiver Lymphozyten durch Antigene, Zytokine und Chemokine darstellen (13).

Die Beteiligung kleiner Rho GTPasen an der Lymphozyten-Chemotaxis nach Stimulation verschiedener Chemokine, unter anderem SDF-1 α und RANTES konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. Nach Stimulation CD4-positiver Lymphozyten mit SDF-1 α induzierte dieses bereits nach kurzer Zeit die Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 (43, 20). Jüngste Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen ähnliche Ergebnisse auch für das auf Lymphozyten chemotaktisch wirksame C-Peptid.

Zheng et alii beschrieben die Möglichkeit der Aktivierung von Rho - GTPasen nach Chemokin-Stimulation über Phosphoinositol-3-Kinasen, deren Produkt, das Phosphatidylinositol(3,4,5)-Triphosphat wiederum die GEFs der Rho-GTPasen aktiviert (70), was mit den Ergebnissen dieser Arbeit auch für die Resistin-induzierte Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten angenommen werden könnte.

4.2.4 Mitogen-activated protein kinase

Weder die Vorinkubation CD4-positiver Lymphozyten mit SB203590 noch mit PD98059 führte zu einer signifikanten Inhibition der Resistin-induzierten Chemotaxis.

SB203590 inhibiert die p38-MAP-Kinase, während PD98059 MEK1/2, eine MAPKK, die ERK1/2 phosphoryliert, hemmt. MAPK stellen eine Gruppe Serin-Threonin-Proteinkinasen dar, die an verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden, wie Differenzierung, Entwicklung, Inflammation, Wachstum und Chemotaxis

beteiligt sind und durch extrazelluläre Signale wie beispielsweise Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Dies führt zur Aktivierung einer MAPKKK, welche nun eine MAPKK, unter anderem MEK1/2 phosphoryliert, die wiederum die entsprechende MAPK, wie p38-MAPK und ERK1/2 phosphoryliert.

Eine gewisse Einschränkung der Ergebnisse ergibt sich aus der Tatsache, dass insgesamt vier Unterformen der p38-MAPK existieren ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), von denen jedoch nur zwei (α und β) durch SB203590 inhibiert werden und die Funktion der beiden anderen p38MAPK nicht im Detail bekannt ist.

In den unten aufgeführten Arbeiten kamen Inhibitor-Konzentrationen von 20 $\mu\text{mol/l}$ bis 50 $\mu\text{mol/l}$, selten auch bis 100 $\mu\text{mol/l}$ zum Einsatz, die hier verwendeten Konzentrationen (50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$) können also als ausreichend gelten.

Die Migrationsversuche mit SB203590 und PD98059 wurden durchgeführt, da sowohl ERK1/2, als auch p38-MAPK bekannte Elemente in der durch Rho GTPasen, insbesondere Rac1 und Cdc42, hervorgerufenen Signalkaskade darstellen (2, 1) und an der Migration diverser Zellen Anteil nimmt. Die Ergebnisse bezüglich einer Beteiligung der MAP-Kinasen an der Chemokin-induzierten Zellmigration sind inkonstant. So zeigten Arai et al., dass ERK1/2 in die SDF-1 α -induzierte Chemotaxis hämatopoetischer Zellen involviert ist (1). MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) stimuliert die Monozyten-Chemotaxis via p38MAPK, involviert jedoch nicht ERK1/2, während MCP-1 die Endothelzell-Chemotaxis via ERK1/2, jedoch nicht p38-MAPK (4) stimuliert. Kukhtina et alii vermuten eine Beteiligung der ERK1/2 MAP-Kinasen bei der IP-10- (interferon- γ -inducible protein-10) induzierten Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten, ohne Nachweis einer Involvierung der p38MAPK (31), dagegen scheint die CXCR3-stimulierte Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten völlig unabhängig von MAP-Kinasen (52). Zusammengefasst hängt also die Beteiligung der MAP-Kinasen an der Chemokin-induzierten Zellmigration in erheblichem Maße von der betrachteten Zellart, sowie dem entsprechenden Chemokin ab, so dass es durchaus denkbar ist, dass MAP-Kinasen nicht in die Resistin-induzierte Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten involviert sind. Zu differenzierteren Einordnung sollten diesbezüglich jedoch weitere Untersuchungen, wie Western Blot-Analysen zum Nachweis phosphorylierter Substrate der MAP-Kinasen folgen.

4.2.5 LIM-Kinase und Cofilin

Western Blot Analysen zeigten eine zeitabhängige Phosphorylierung der beiden an der Zellmigration beteiligten Proteine LIM- domain-containing protein kinase (LIM-Kinase) und Cofilin.

Die Serin/Threonin Kinasen LIMK, von denen zwei bekannte Isoformen, LIMK1 und LIMK2 existieren, regulieren die Aktinpolymerisation, indem sie Cofilin phosphorylieren (Serin3) (16, 3). LIMK wiederum wird über Rho GTPasen reguliert. Rac1 und Cdc42 induzieren die Phosphorylierung von PAK (p21-activated kinase), welche daraufhin LIMK an Threonin-508 phosphoryliert und damit aktiviert (15, 7). Auch die kleine GTPase RhoA führt über ROCK (Rho Kinase) zur Phosphorylierung von LIMK (37). Gorovoy et al. zeigten darüber hinaus, dass LIMK in die Mikrotubuli-Destabilisierung involviert ist, was einerseits zur Bildung von Aktinfasern führt und andererseits die Zellkontraktilität fördert (19).

Das Substrat der LIM-Kinasen Cofilin ist ein kleines (19 kDa) ubiquitär vorkommendes Protein, welches sowohl an monomeres G-, als auch an filamentöses F-Aktin binden kann, wobei es eine höhere Affinität für ADP-gebundenes Aktin besitzt. Es induziert einerseits die Aktindepolymerisation vom (-)-Ende der Aktinfilamente, wodurch neue Bausteine für die de novo Aktinpolymerisation in Bewegungsrichtung der Zelle entstehen (8). Darüber hinaus induziert Cofilin die Fragmentierung von F-Aktin, um freie (+)-Enden für die weitere Aktinpolymerisation zu schaffen (14).

Der Nachweis des vermehrten Vorhandenseins phosphorylierter LIMK, sowie phosphorylierten Cofilins in mit Resistin stimulierten CD4-positiven Lymphozyten legt die Vermutung nahe, dass sowohl die LIM-Kinasen als auch Cofilin am Ende der Signalkaskade stehen, die für die Resistin-induzierte Chemotaxis CD4-positiver Lymphozyten verantwortlich ist.

4.3 Intrazelluläre Signaltransduktion

Abb. 11 zeigt das mögliche Zusammenspiel der in Migrations-Experimenten und Western Blot-Analysen untersuchten Signalmoleküle, sowie deren Inhibitoren, ergänzt durch die für SDF-1 α und RANTES vorgeschriebene intrazelluläre Signalkaskade innerhalb der Chemokin-induzierten Zellmigration.

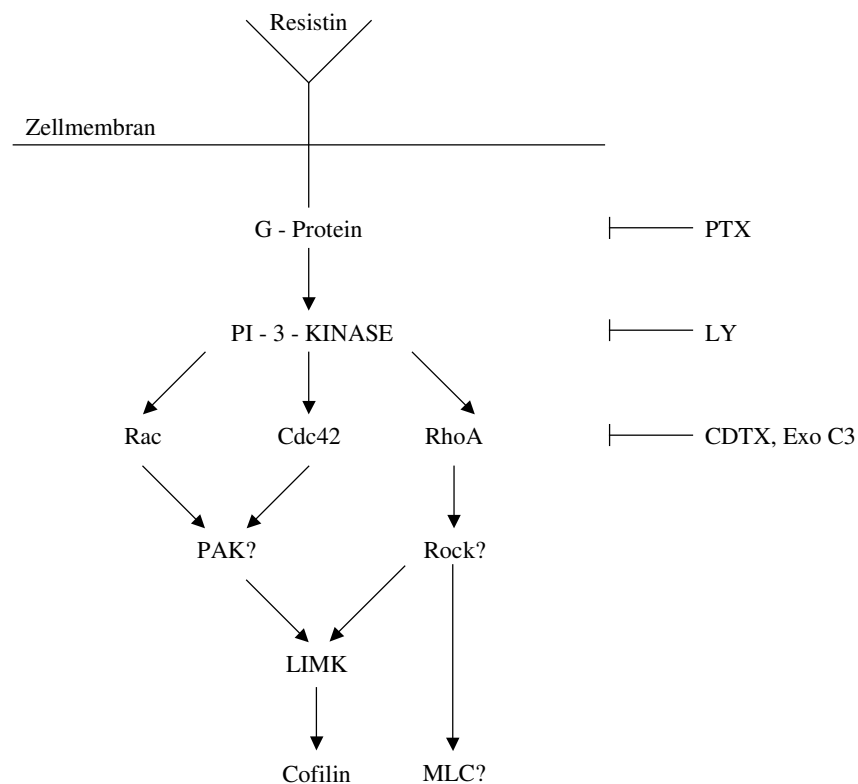


Abb. 11: Darstellung der in Migrations-Experimenten und in Western Blots untersuchten Signalmoleküle, sowie deren Hemmstoffe.

Die mit Fragezeichen versehenen Signalmoleküle PAK, Rock und MLC konnten in dieser Arbeit nicht hinreichend untersucht werden. Näheres s. Diskussion.

—▶ aktiviert; |— inhibiert

PTX: Pertussistoxin, inhibiert Pertussistoxin-sensitive G-Proteine; LY: inhibiert PI-3-Kinasen; CDTX: Clostridium difficile Toxin B, inhibiert die Rho GTPasen Rac, Cdc42, RhoA; Exo C3: Clostridium botulinum Exoenzym C3, inhibiert die Rho GTPase RhoA.

G-Protein: G-Protein gekoppelter Rezeptor; PI-3-Kinase: Phosphoinositol-3-Kinase; Rac/Cdc42/RhoA: kleine GTPasen/Rho GTPasen; PAK: p21-activated Kinase; Rock: Rho-associated Kinase; LIMK: LIM-Kinase; MLC: myosin light chain kinase.

4.4 Bedeutung für die Atherogenese

Die Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Gefäßwand stellt einen zentralen Schritt innerhalb der Atherogenese dar. Diese Arbeit legt die Vermutung nahe, dass Resistin an diesem frühen Stadium der Arteriosklerose-Entwicklung als proatherogen wirkendes Adipozytokin teilnimmt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Resistin in der Intima früher atherosklerotischer Plaques kumuliert und dort mit CD4-positiven Lymphozyten kolokalisiert. Diese Studie demonstriert darüber hinaus, dass Resistin einen chemotaktischem Effekt auf diese Zellen ausübt. So kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Resistin, welches innerhalb atherosklerotischer Läsionen von Makrophagen sezerniert wird, in solchen Läsionen kumuliert und dort als chemotaktischer Stimulus die Migration CD4-positiver Lymphozyten in das betroffene Gefäß fördert. Zusammen mit den Studien anderer Arbeitsgruppen, die darüber hinausgehende proatherogene Wirkungsweisen von Resistin, wie die Induktion der Proliferation glatter Muskelzellen, sowie die Aktivierung von Endothelzellen, welche daraufhin vermehrt Leukozytenadhäsionsfaktoren, sowie VEGFR und MMPs sezernieren, aufgezeigt haben, stützen die hier erhobenen Daten die Vermutung, dass Resistin neben metabolischen Effekten auch eine aktive Rolle in der Entwicklung einer diffusen Arteriosklerose spielt. Im besonderen Maße betrifft dies Typ 2 Diabetiker, da hier hohe Serum-Resistin-Konzentrationen vorliegen und diese Patienten bekanntermaßen eine Hochrisikopopulation für die Entstehung einer ausgeprägten Arteriosklerose darstellen. Die hier dargestellten Ergebnisse vermitteln jedoch nur anfängliche Betrachtungen eines umfangreichen Gebietes und sollten in weiteren Studien vertieft und erweitert werden.

V. Zusammenfassung

Das Adipozytokin Resistin zeigt neben seinen metabolischen Effekten auch eine proatherogene Wirkung. Es kumuliert in atherosklerotischen Läsionen und stimuliert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Endothelzellaktivierung, mit konsekutiv vermehrter Expression von Endothelin 1 und Adhäsionsmolekülen. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob Resistin die Migration CD4-(cluster of differentiation 4) positiver Lymphozyten, die im Rahmen der inflammatorischen Reaktion der frühen Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielt, induziert.

In einer modifizierten Boyden-Kammer zeigte sich die konzentrationsabhängige Induktion der Chemotaxis CD4-positiver Zellen durch Resistin mit einem Maximum bei 100 ng/ml. Die Resistin-induzierte Migration konnte durch Zugabe von Pertussistoxin, einem Hemmstoff Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine sowie nach Zugabe von LY294002, einem Phosphoinositol-3-Kinase Hemmstoff, signifikant inhibiert werden. Mit Hilfe der Inhibitoren *Clostridium botulinum* Exoenzym C3 und *Clostridium difficile* Toxin B konnte eine Beteiligung der kleinen Guanosintriphosphatasen (GTPasen) RhoA, Rac (Ras-related C3 botulinum substrate) und Cdc42 (Cell division cycle 42) gezeigt werden. Eine Beteiligung der Mitogen-activated protein kinasen konnte nach Versuchen mit SB203590 und PD98059 ausgeschlossen werden. In Western-Blot-Analysen zeigte sich eine zeitabhängige Phosphorylierung der beiden am Ende der Migrations-Signalkaskade stehenden Proteine LIM-domain-containing kinase und Cofilin.

Somit könnte Resistin eine Bedeutung in der Atherogenese spielen, indem es in atherosklerotischen Läsionen als chemotaktischer Stimulus die Einwanderung CD4-positiver Lymphozyten in das Gefäß fördert und so den inflammatorischen Prozeß amplifiziert.

VI. Literaturverzeichnis

1. Arai A, Aoki M, Weihua Y, Jin A, Miura O. CrkL plays a role in SDF-1 induced activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway through Ras and Rac to mediate chemotactic signaling in hematopoietic cells. *Cell Signa.* 2006; 18: 2162-2171
2. Arai A, Jin A, Yan W, Mizuki D, Yamamoto K, Nanki T, Miura O. SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through its effector PAK kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis. *Cell Signal.* 2005; 17: 497-506
3. Arber S, Barbayannis FA, Hauser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P. Regulation of actin-dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 1998; 393: 805-809
4. Arefieva TI, Kukhtina NB, Antonova OA, Krasnikova TL. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. *Cytokine.* 2005; 31: 439-446
5. Bacon KB, Camp RD. IL-8-induced in vitro human lymphocyte migration is inhibited by cholera and pertussis toxin and inhibitors of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 169: 1099-1104
6. Blades MC, Manzo A, Ingegnoli F, Taylor PR, Panaryi GS, Irjala H, Jalkanen S, Haskard DO, Perretti M, Pitzalis C. Stromal cell-derived factor 1 (CXCL 12) induces human cell migration into lymph nodes transplanted into SCID mice. *J Immunol.* 2002; 168: 4308-4317
7. Bokoch GM, Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 743-781
8. Bramburg JR, Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of the actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 185-239
9. Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases. NIH funding decreases. *Nat Med.* 1997; 3: 600-601
10. Bühling KJ. Grundlagen zur Pathologie des Kreislaufes. In: Bühling KJ, Lепенies J, Witt K. *Allgemeine und spezielle Pathologie.* 2. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Jena. 2000: 101-120

11. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004; 167-179
12. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ETH. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 and phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *Circulation*. 2004; 110: 3335-3340
13. Cantrell DA. GTPases and T cell activation. *Immunol Rev*. 2003; 192: 122-130
14. Chan AY, Bailly M, Zebda N, Segall JE, Condeelis JS. Role of cofilin in epidermal growth factor stimulated actin polymerisation and lamellipod protusion. *J Cell Biol*. 2006; 148: 531-542
15. Chong C, Tau L, Lim L, Mauser E. The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem*. 2001; 276: 17347-17353
16. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by PAK-1 couples Rac/Cdc42 GTPases signaling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*. 1999; 1: 253-259
17. Eppinger T. Immunsystem. In: Renz-Polsterer H, Braun J (Hrsg.). *Basislehrbuch Innere Medizin*, 2. Auflage, Urban und Fischer, München Jena. 2001: S. 329-391
18. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th 1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999; 145: 33-43
19. Gorovoy M, Niu J, Bernard O, Profirovic J, Minshall R, Neamu R, Voynoy-Yasenetskaya T. LIM-kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerisation in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2005; 280: 2666533-26542
20. Haddad E, Zugaza JL, Lonacke F, Debili N, Crouin C, Schwarz K, Fischer A, Vainchenker W, Bertoglio J. The interactions between Cdc42 and WASP is required for SDF-1 induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood*. 2001; 97: 33-38

21. Hamm HE. The many faces of G-protein signaling. *J Biol Chem.* 1998; 273: 669-672
22. Hansson GK, Holm J, Jonasson J. Detection of activated T-lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 1989; 135: 169-175
23. Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanism in atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 567-578
24. Hau J, Hajjar DP, Febbaio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD 36. *J Biol Chem.* 1997; 272: 21654- 21659
25. Hu WL, Qiao SB, Hou Q, Yuan JS. Plasma resistin is increased in patients with unstable angina. *Chin Med J (Engl.).* 2007; 120: 871-875
26. Huelsenbeck J, Dreger SC, Gerhard R, Fritz G, Just I, Genth H. Upregulation of the immediate early gene product Rho B by exoenzyme C3 from *Clostridium limosum* and Toxin B from *Clostridium difficile*. *Biochemistry.* 2007; 4: 4923-4931
27. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 1986; 6: 131-138
28. Jung HS, Park KH, Cho JM, Chung SS, Cho HJ, Cho SJ, Kim SY, Lee HK, Park KS. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 76-85
29. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsonomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponektin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 31: 415-419
30. Kongias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Effects of adipocyte derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. *J Surg Res.* 2005; 126: 121-129
31. Kukhtina NB, Arefieva T, Krasnikova TL. Intracellular signal cascade in CD4+ T-lymphocyte migration stimulated by interferon-gamma- inducible protein-10. *Biochemistry (Mosc.).* 2005; 70: 652-656

32. Kunnari A, Ukkola O, Päiväusalo M, Kesäniemi YA. High plasma resistin level is associated with enhanced highly sensitive C-reactive protein and leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 2755-2760
33. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assesment of the evidence and the need for future research. *Circulation.* 1997; 96: 4095-4103
34. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol.* 1996; 7: 330-335
35. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001; 104: 365-372
36. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995; 91: 2844-2850
37. Maekawa M, Ishizaki T, Bokoy S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 1999; 285: 895-898
38. Matinet Y, Matinet N, Vignaud JM, Plenat F. Blood monocyte chemotaxis. *J Immunol Methods.* 1994; 174: 209-214
39. Mc Ternan P, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, Mc Ternan CL, Clark P, Smith S, Barnett A, Kumar S. Resistin and Type 2 Diabetes: regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *J Clin Endocrinol And Metab.* 2005; 88: 6098-6106
40. Mu H, Okashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q, Chen C. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006; 70: 146-157
41. Nanki T, Lipsky PE. Cutting Edge: Stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4-positive T cell activation. *J Immunol.* 2000; 164: 5010-5014
42. Napoli C, D'Armiento FP, Maucin FP. Fatty streak formation occurs in

- human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin West.* 1997; 100: 2680-2690
43. Nijhera R, van Hennik PP, Gignac ML, Kruhlak MJ, Hordijk PL, Delon J, Shaw S. Rac 1 mediates collapse of microvilli on chemokine-activated T lymphocytes. *J Immunol.* 2004; 173: 4985-4993
44. Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell.* 1995; 81: 53-62
45. Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2007; 156: 279-284
46. Procko E, Mc Coll SR. Leukocytes on the move with phosphoinositide-3-kinase and its downstream effectors. *Bioessays.* 2005; 27: 153-163
47. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 2004; 265: 23-32
48. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-126
49. Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J.* 1999; 18: 501-511
50. Schule JS, Marks RE, Boss GR. Signaling by small GTPases in the immune system. *Immunol Rev.* 2007; 218: 92-101
51. Serrador JM, Nieto M, Sanchez-Madrid F. Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol.* 1999; 9: 228-233
52. Smit MJ, Verdijk P, van der Raag-Helmer EM, Navis M, Hensbergen PJ, Leurs R, Teusen CP. CXCR-3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi-and phospholipase C-dependent pathway not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3-kinase. *Blood.* 2003; 102: 1959-1965
53. Sotosis Y, Ward SG. Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev.* 2006; 177: 217-

54. Sotosis Y, Whittaker GL, Westwick J, Ward SG. The CXC chemokine stromal cell derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol.* 1999; 163: 5954-5963
55. Stary HC. The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (Hrsg.). *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Vol 1. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996: 463-474
56. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997; 272: 20963-20966
57. Stemme S, Hansson GK. Immune mechanism in atherogenesis. *Ann Med.* 1996; 26: 141-146
58. Stephens LR, Eguinosa A, Erdjument-Bronage H. The G $\beta\gamma$ sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell.* 1997; 89: 105-114
59. Stephens LR, Smrcka AS, Cooke FT, Jackson TR, Sternweiss PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3-kinase activity in myeloid cells is activated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell.* 1994; 77: 83-93
60. Steppan CM, Baily ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001; 409: 307-312
61. Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13: 18-23
62. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 2001; 81: 153-208
63. Tau W, Martin D, Gutkind JS. The G α_{13} -Rho signaling axis is required for SDF-1 induced migration through CXCR4. *J Biol Chem.* 2006; 281: 39542-39549
64. Turner L, Ward SG, Westwick J. Rantes-activated human T lymphocytes: a role for phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol.* 1995; 155: 2437-2444
65. Vanhaesebroeck B, Leevers S, Khatareh A. Synthesis and function of 3-phosphorylated lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 535-602

66. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedate P, Li RK, Weisel RD, Michle D. Resistin promotes endothelial cell activation. *Circulation*. 2003; 108: 24-28
67. Vogelsang M, Pautsch A, Aktories K. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007; 374: 347-360
68. Walcher D, Aleksic M, Jerg V, Hombach V, Zieske A, Homma S, Strong J, Marx N. C-peptide induces chemotaxis of human CD4-positive cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins and phosphoinositide 3-kinase. *Diabetes*. 2004; 53: 1664-1670
69. Ward SG. Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol*. 2004; 25: 67-74
70. Zheng Y, Quilliam LA. Activation of the Ras superfamily of small GTPases. Workshop on exchange factors. *Embo Rep*. 2003; 4: 463-468

VII. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Vinzenz Hombach für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ich möchte ganz besonders Herrn Prof. Dr. Nikolaus Marx, der mir stets mit Rat und Tat zu Seite stand, für die herausragende Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Daniel Walcher danke ich herzlichst für die immer bemühte und freundliche Unterstützung, sowie für die vielen Anregungen beim Schreiben dieser Arbeit.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe, allen voran Frau Miriam Reuß, Frau Helga Bach, Frau Renate Durst und Frau Susanne Betz, bedanke ich mich für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit, wodurch viele schöne Stunden und eine angenehme Arbeitsatmosphäre entstanden sind.

Vielen Dank auch meinem PC-Administrator Herr Ronald Thiess für die geduldige Unterstützung und großartige Hilfe bei der Umsetzung meiner Gedanken in ein Word-Dokument.