

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

Zentrum der Dermatologie und Venerologie  
Direktor Herr Professor Dr. med. Roland Kaufmann

Die Rolle von Junctional Adhesion Molecule-B bei der Extravasation von T-  
Lymphozyten

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereiches Medizin der Johann  
Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main vorgelegt von

Maximilian Hatting  
aus Münster/ Westfalen

Frankfurt am Main 2009

Dekan            Prof. Dr. J. Pfeilschifter  
Referent:        Prof. Dr. W.H. Boehncke  
Koreferent:     Prof. Dr. H.H. Radeke

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2009

Für meine Eltern in Liebe und Dankbarkeit



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	9
1.1	Die Entzündung	9
1.1.1	Lebensrettende Schutzreaktion	9
1.1.2	Pathologische Fehlregulation	9
1.1.3	Perfektes Zusammenspiel- passgenauer Zellverkehr	10
1.2	Die Extravasation	10
1.3	Adhäsionsmoleküle	11
1.3.1	Selectine	12
1.3.2	Vaskuläre Addressine	12
1.3.3	Integrine	13
1.3.4	Immunglobulin-Familie	13
1.4	Die Familie der Junctional Adhesion Molecules (JAM)	14
1.4.1	Die Bausteine der JAMs	15
1.4.2	Bindungsverhalten und Bindungspartner	16
1.4.3	Funktionelle Vielseitigkeit	17
1.5	Die T- Lymphozyten	18
1.5.1	T-Lymphozyten können zahlreiche Adhäsionsmoleküle exprimieren	18
1.6	Die Endothelzellen	19
1.6.1	Endothelzellen bilden eine Barriere	19
1.6.2	JAMs sind auf Endothelzellen unterschiedlich lokalisiert	19
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	21
2.1	Material	21
2.2	Methoden	24
2.2.1	Gewinnung von Leukozyten	24
2.2.2	Isolation der T-Lymphozyten	25
2.2.3	Kultivierung der HUVEC Zellen	26
2.2.4	Pflege der Zellen in der Kulturf flasche (ZK)	26
2.2.5	Separieren der Zellen	27
2.2.6	Pflege der Zellen auf dem Slide	27
2.2.7	Flusskammer mit Proteinbeschichtung	28
2.2.8	Berechnung des Scherkraft	28
2.2.9	Aufbereitung der T-Lymphozyten am Versuchstag	29
2.2.10	Reinigung der Glasslides	30
2.2.11	Beschichtung mit JAM-B Protein	31
2.2.12	Immunfluoreszenz	31

2.2.13	Flusskammer mit HUVEC .....	32
2.2.14	Mikroskopie und Filmaufzeichnung .....	32
2.2.15	Auswertung der Filme .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	34
3.2	JAM-B lässt sich auf einer Glasoberfläche fixieren und bildet eine homogene Schicht .....	35
3.3	T-Lymphozyten rollen auf einer JAM-B beschichteten Oberfläche .....	35
3.4	Auf einer JAM-B beschichteten Oberfläche adhären T-Lymphozyten bevorzugt .....	36
3.5	Ein Antikörper gegen $\beta 1$ Integrin und ein VLA-4 Antikörper vermindern das Rolling von T-Lymphozyten auf JAM-B .....	37
3.6	Die Kombination von VLA-4 und $\beta 1$ spezifischen Antikörpern haben keinen additiven Effekt im Vergleich zur Einzelgabe .....	38
3.7	Die Blockade von $\beta 1$ Integrin erhöht die Geschwindigkeit der rollenden Zellen .....	39
3.8	Die Blockade von VLA-4 und $\beta 1$ vermindert die Zahl adhärenter T-Lymphozyten auf JAM-B .....	40
3.9	JAM-C hat keinen Einfluss auf das Rolling von T-Lymphozyten .....	41
3.10	Relevanz von JAM-B für Interaktionen von Endothelzellen und T-Lymphozyten .....	41
3.11	Ein JAM-B Antikörper vermindert Rolling von T-Lymphozyten .....	42
3.12	Ein JAM- B Antikörper erhöht die mittlere Rollgeschwindigkeit von T-Lymphozyten .....	43
3.13	Ein JAM-B Antikörper hat keinen Einfluss auf die feste Adhäsion von T-Lymphozyten .....	44
3.14	Die Auswertungsergebnisse sind unabhängig vom Untersucher .....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>46</b>
4.1	Flusskammersysteme als Modelle für menschliche Blutgefäße .....	46
4.2	Zellen reagieren auf Shear-Stress .....	46
4.3	Gewinnung der Ergebnisse .....	47
4.4	Ergebnisse .....	48
4.5	T-Lymphozyten interagieren unter dynamischen Bedingungen mit JAM-B .....	48
4.5.1	Rolling wird durch zahlreiche Adhäsionsmoleküle vermittelt .....	48
4.5.2	Die JAMs beeinflussen die Leukozytenwanderung .....	49
4.5.3	Transmigration ist von mehreren Adhäsionsmolekülen abhängig .....	50

4.5.4	Die $\beta$ 1 Untereinheit des VLA-4 bindet an JAM-B .....	50
4.6	Integrine sind vielseitige Signalmoleküle .....	51
4.7	Die JAM Expression ist bei Krankheit verändert .....	52
4.8	Die Familie der JAMs: differenzierte Expression .....	53
4.9	Die Familie der JAMs: differenzierte Adhäsion.....	53
4.10	Ergebnisse in Zusammenschau und Probleme dieser Arbeit.....	54
4.10.1	Ist JAM-B Bindung an VLA-4 unabhängig von JAM-C?.....	54
4.10.2	Warum vermindert JAM-B Blockade das Rolling, aber nicht die Adhäsion? .....	54
4.10.3	Verhindert JAM-B die Rückwanderung der Immunzellen in die Blutgefäße (reversed transmigration) ? .....	55
4.11	JAM-B ist ein vielseitiges Adhäsionsmolekül.....	56
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>68</b>
7.1	Abbildungen .....	68
7.2	Tabellen.....	68
7.3	Lebenslauf.....	70
7.4	Schriftliche Erklärung .....	71



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entzündung

Die Beobachtung „rubor et tumor cum calor et dolor“ geht auf den mittelalterlichen Paracelsus zurück, der als einer der Ersten die Entzündungsreaktion klinisch beschrieb.

Im 19. Jahrhundert fügte Rudolf Virchow die „functio laesa“ hinzu, da er erkannte, dass entzündete Gewebe auch in ihrer Funktion gestört waren. Ein Schüler Virchows, Julius Conheim, machte die Entdeckung, dass Entzündung mit einer Exsudation von Blutplasma und einem lokalen Infiltrat von Leukozyten einhergeht.

Auch heute gilt dieses Grundkonzept der Entzündung, was histopathologisch Ausdruck findet in einer lokalen Gefäßerweiterung mit erhöhtem Blutfluss, einer erhöhten Gefäßpermeabilität und einem leukozytären Infiltrat<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Lebensrettende Schutzreaktion

Die Entzündung stellt eine extrem wichtige physiologische Reaktion unseres Immunsystems dar. Sie ist essentieller Mechanismus für die Abwehr pathogener Organismen und Antwort auf das Einwirken schädlicher Noxen. Obwohl das klinische Bild der Entzündung von Gewebe zu Gewebe variiert, spielen sich auf zellulärer Ebene immer wieder ähnliche Vorgänge ab, an denen die Zellen des Immunsystems beteiligt sind. Aber auch alle anderen Körperzellen, die sich im Bereich einer Entzündung befinden, werden beeinflusst und verändert, was dann zur äußerlich sichtbaren Entzündungsreaktion führt. Obwohl überall im Körper vorkommend, sind jedoch die Mechanismen, die sie steuern und regulieren, sehr unterschiedlich und hochspezifisch. Diese Regulation stellt für das Immunsystem eine besondere Herausforderung dar, denn eine genaue Kontrolle der Lokalisation sowie der Stärke der Entzündung ist so notwendig wie die Reaktion selbst.

Aus diesem Grunde hat sich unser Immunsystem zu einer Einheit aus verschiedensten, zum Teil hoch spezialisierten Zellen entwickelt, die über ein äußerst differenziertes System aus Oberflächenmolekülen und Chemokinen den Weg zum Ort des pathologischen Geschehens finden und eine suffiziente Immunantwort generieren.

### 1.1.2 Pathologische Fehlregulation

Störungen dieser komplexen Regulation können sowohl eine Abschwächung als auch eine Steigerung der Entzündungsreaktion hervorrufen. In letzterem Falle spricht man von pathologischer Entzündung. Die pathologische Entzündung spielt bei vielen Erkrankungen in der Dermatologie eine Rolle. Hier sind als Beispiele allergische Reaktionen wie z.B. allergische Kontaktekzeme oder (Auto-)Immunerkrankungen der Haut wie Psoriasis zu nennen<sup>2,3</sup>.

### 1.1.3 Perfektes Zusammenspiel- passgenauer Zellverkehr

So unterschiedlich sich entzündete Gewebe makroskopisch präsentieren, so groß ist auch die Vielzahl unterschiedlicher Zellen, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Es wirken die gewebsständigen Makrophagen und die Zellen des humoralen Immunsystems zusammen. Für letztere ist es unumgänglich, aus der Blutbahn in das Gewebe einzuwandern, um am Ort der Entzündung wirken zu können. Insofern kommt der Extravasation als erstem Schritt eine entscheidende Rolle zu. Die Kräfte, die in einem Blutgefäß auf den Leukozyten wirken, sind so groß, dass eine Extravasation nur mit Hilfe von auf Endothel und Leukozyt exprimierten Adhäsionsmolekülen möglich ist. Dies sind Oberflächenantigene, die nach gegenseitiger Bindung zur Extravasation von Leukozyten und anderen mononukleären Zellen beitragen. Auf die verschiedenen Adhäsionsmoleküle und ihre Rolle bei der Extravasation wird weiter unten genauer eingegangen. Die Vielzahl von zum Teil hochspezifischen Adhäsionsmolekülen in den Geweben und auch auf den Leukozyten sowie ihre variable Expression erlaubt eine komplex regulierte Entzündungskaskade mit geregelterm Zellverkehr.

## 1.2 Die Extravasation

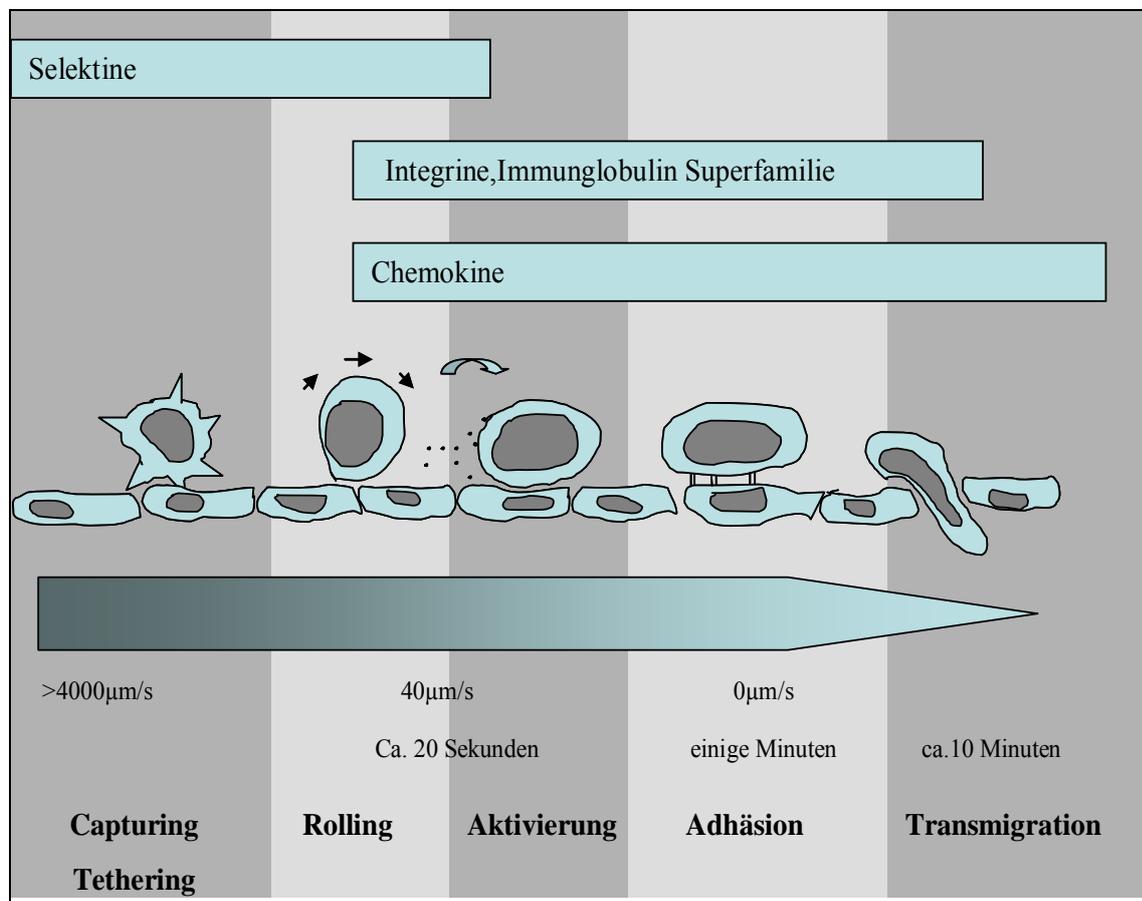


Abbildung 1: die Phasen der Extravasation

Die Extravasation beginnt mit der Kontaktaufnahme zwischen Leukozyt und Endothelzelle in den postkapillären Venolen, die sich in verschiedene Schritte untergliedert. Diese Schritte sind bei allen Arten von Leukozyten prinzipiell gleich. Zunächst kommt es zu einer Verringerung der Flussgeschwindigkeit der Leukozyten im Blut von ca. 4000  $\mu\text{m}/\text{sec}$ . auf ca. 40  $\mu\text{m}/\text{sec}$ <sup>4</sup>. Dieser Prozess, als Rolling bezeichnet, wird von Oberflächenmolekülen der Leukozyten und Endothelzellen vermittelt. Das Adhäsionsmolekül P-Selectin, das in den Endothelzellen in den Weibel-Palade-Körperchen vorhanden ist, wird Minuten nach der Ausschüttung von Leukotrien B<sub>4</sub>, Ca<sup>2+</sup> oder Histamin an der lumenseitigen Zellmembran exprimiert<sup>5,6,7,8</sup>. Einige Stunden nach dem Kontakt mit z.B. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) erscheint zudem E-Selektin an der Oberfläche der Endothelzelle. P- und E-Selektin treten mit Glycoproteinen der Leukozytenoberfläche in Verbindung und erlauben es diesen, auf dem Endothel zu rollen<sup>7,8</sup>. Die Reduktion der Geschwindigkeit ermöglicht es den Leukozyten zudem, das Endothel nach Adhäsionsmolekülen abzutasten, die mit den eigenen Oberflächenmarkern interagieren können.

Dies sind die Leukozytenintegrine lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) und complement receptor-3 (CR-3), die mit dem Immunglobulin-ähnlichen Molekül intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) der Endothelzelle interagieren und zu einer lockeren Bindung des Leukozyten an das Endothel führen<sup>7,8</sup>. Um fest adhären zu können, werden die Leukozyten in einem G-Protein gekoppelten Prozess aktiviert, hier spielen Chemokine eine Rolle, wie sie etwa von Makrophagen sezerniert werden<sup>9,10</sup>. Beispielsweise erhöht die Anwesenheit von Interleukin-8 die Bindungskapazität von LFA-1 und CR-3 durch Konformationsänderung dieser Proteine<sup>7</sup>. Dies führt letztendlich zu einer starken Bindung an das Endothel, das Rolling stoppt.

Die nun fest gebundenen Leukozyten können mit Hilfe weiterer spezifischer Moleküle zwischen den Endothelzellen hindurchwandern und so in das Zielgewebe gelangen. Auf den Leukozyten vermitteln LFA-1 und CR-3 (Alternativname: MAC-1) diesen Schritt. Zudem ist das Immunglobulin-ähnliche Protein platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) beteiligt, das sowohl von Leukozyten als auch von Endothelzellen im Bereich der Interzellularverbindungen exprimiert wird<sup>11</sup>. Anschließend durchwandern die Leukozyten mit Hilfe proteolytischer Enzyme die Basalmembran und dringen in das Gewebe ein<sup>12</sup>.

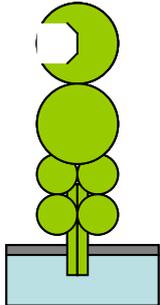
### 1.3 Adhäsionsmoleküle

Die Nomenklatur der Adhäsionsmoleküle ist verwirrend, denn viele wurden zuerst als Oberflächenmoleküle auf den Zellen entdeckt, bevor ihre Struktur und Funktion genauer charakterisiert wurde. Sie lassen sich aber in vier große, jeweils strukturverwandte Gruppen einteilen.

### 1.3.1 Selectine

Die Selectine sind wichtig für die gewebspezifische Einwanderung der Leukozyten, sogenanntes Homing, und werden sowohl von Leukozyten (L-Selectin) als auch von Endothel (P-Selectin und E-Selectin) exprimiert. Es sind Oberflächenmoleküle mit gemeinsamer Grundstruktur, die sich durch das Vorhandensein von verschiedenen Lectin-ähnlichen Domänen im extrazellulären Anteil unterscheiden. Lectine binden an bestimmte Zucker, die als Seitenketten von einigen Molekülen wie Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1) oder CD34 auf Endothelzellen oder cutaneous lymphocyte antigen (CLA) auf Leukozyten fungieren<sup>12,13,14</sup>.

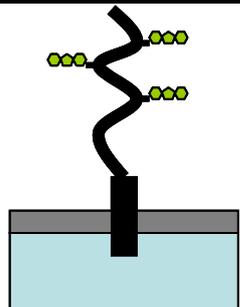
**Tabelle 1: Selectine, Übersicht**

Selectine		Name (alternativ)	Vorkommen	Ligand
Bindung an Zuckergruppen, sorgen für Leukozyten-Endothel-Kontakt		L-Selectin (MEL14, CD62 L)	Naive und Memory T-Zellen, Neutrophile, Monozyten, Macrophagen, Eosinophile	GlyCAM 1, CD34, MAdCAM-1, Sialyl-Lewis <sup>x</sup>
		P-Selectin (PADGEM, CD62 P)	aktivierte Endothelzellen und Thrombozyten	Sialyl-Lewis <sup>x</sup> , PSGL 1
		E-Selectin (ELAM 1, CD62 E)	aktivierte Endothelzellen	Sialyl-Lewis <sup>x</sup>

### 1.3.2 Vaskuläre Adressine

Sie werden auf Endothelzellen exprimiert. Die glycosylierten Seitenketten sind wichtig, da sie für die Bindung, z.B. an L-Selectin verantwortlich sind. Adressine sind wichtig für die Gewebsspezifität bei der Auswanderung von Leukozyten. Um die Endothelbarriere zu überwinden, werden allerdings andere Moleküle benötigt<sup>15,16</sup>.

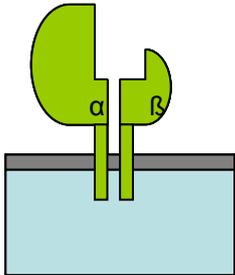
**Tabelle 2: Adressine, Übersicht**

Adressine		Name (alternativ)	Vorkommen	Ligand
Bindung an L-Selectin, sorgen für Leukozyten-Endothel-Kontakt		CD34	Endothel	L-Selectin
		GlyCAM 1	Venolen mit hohem Endothel (HEV)	L-Selectin
		MadCAM 1	HEV in Peyer-Plaques	L-Selectin Integrin $\alpha 4\beta 7$

### 1.3.3 Integrine

Die Integrine gehören zu einer großen Proteinfamilie, die die Bindung zwischen Zellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix vermitteln. Ein Integrinmolekül besteht aus einer großen  $\alpha$ -Kette die nicht-kovalent mit einer kleineren  $\beta$ -Kette assoziiert ist. Als Beispiele seien hier die T-Zellintegrine VLA-4 und LFA-1 genannt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Extravasation von Effektor-T-Lymphozyten in periphere Gewebe als Liganden der endothelialen Moleküle ICAM-1 und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)<sup>11,12</sup>.

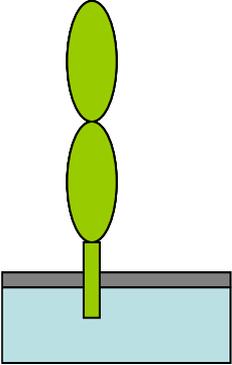
**Tabelle 3: Integrine, Übersicht**

Integrine		Name (alternativ)	Vorkommen	Ligand
Binden an Zell-Adhäsionsmoleküle, starke Adhäsion		$\alpha\beta2$ (LFA1, CD11 a CD18)	Monozyten, T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen	ICAMs
		$\alpha m\beta2$	Monozyten Makrophagen Neutrophile,	ICAM1, iC3b, Fibrinogen
		$\alpha x\beta2$ (CR4, p150.95, CD11c/ CD18)	Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen	iC3b
		$\alpha4\beta1$ (VLA-4, LPAM2, CD49d/ CD29)	Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten	VCAM1, Fibronectin
		$\alpha5\beta1$ (VLA-5, CD49d/ CD29)	Monozyten, Makrophagen	Fibronectin
		$\alpha4\beta7$ (LPAM1)	Lymphozyten	MadCAM1
		$\alpha e\beta7$	Intraepitheliale Lymphozyten	E- Cadherin

### 1.3.4 Immunglobulin-Familie

Viele Adhäsionsmoleküle sind Mitglieder der Immunglobulin- Superfamilie, unter anderem die Antigenrezeptoren von T- und B- Zelle. Auch die strukturverwandten Moleküle ICAM-1,-2 und -3 gehören dazu. Sie werden auf Endothel und Antigen-präsentierenden- Zellen exprimiert und sind Ligand des T-Zellintegrins LFA-1. Die Bindung an diese Moleküle ermöglicht es der T-Zelle, die Gefäßwand zu durchwandern<sup>12,15</sup>.

**Tabelle 4: Immunglobulinfamilie, Übersicht**

Immunglobulin-Superfamilie		Name (alternativ)	Vorkommen	Ligand
Verschieden Rollen bei der Zelladhäsion. Liganden der Integrine		CD2 (LFA-2)	T- Zellen	LFA-3
		ICAM-1 (CD54)	Aktiviertes Endothel, Lymphozyten, dendritische Zellen	LFA-1, Mac-1
		ICAM2 (CD102)	Endothel, dendritische Zellen	LFA-1
		ICAM-3 (CD50)	Lymphozyten	LFA-1
		LFA-3 (CD 58)	Lymphozyten, Antigen präsentierende Zellen (APC)	CD2
		VCAM-1 (CD106)	aktiviertes Endothel	VLA-4
		JAM-4	Endothelzellen von Mäusen	JAM-4
		JAM-L	Leukozyten	JAM-L
	JAM A,-B,-C	Siehe Tabelle unten		

## 1.4 Die Familie der Junctional Adhesion Molecules (JAM)

Eine Untergruppe dieser Adhäsionsmoleküle bildet die Familie der Junctional Adhesion Molecules, kurz JAM-Proteine genannt. Man unterteilt sie in zwei Gruppen. Zum einen in die der JAM- verwandten Proteine, das sind ESAM, CAR, JAM-4 und JAM-L.

Sie besitzen ein Klasse-1 PDZ Bindungsmotiv (außer JAM-L)<sup>17</sup>.

**Tabelle 5: JAM-verwandte Proteine**

Name	Vorkommen	Funktion
CAR	Epithelzellen, Herzmuskelzellen, Spermatozoen, männl. Keimzellen	Transmigration von Neutrophilen, Embryogenese, Spermatogenese
ESAM	Endothelzellen	Transmigration von Neutrophilen
JAM-4	Epithelzellen, männl. Keim-Progenitorzellen, Zellen der Hämatopoese	Regulation der Zellpermeabilität
JAM-L	neutrophile Granulozyten	Transmigration

Zu den klassischen JAMs zählen JAM A, -B, und -C, die ein Klasse 2 PDZ Bindungsmotiv besitzen. Auf der extrazellulären Seite besitzen sie zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen, eine variable (IgSF V1) und eine konstante (C2). Eine einzelne Domäne durchspannt die Zellmembran, intrazellulär befindet sich das PDZ-Motiv<sup>18</sup>.

**Tabelle 6: JAM-Proteine, Übersicht**

Name	Vorkommen	Funktion	Ligand
JAM-A	Endothel und Epithel von: Plazenta, Lunge, Leber, Niere Pankreas, Herz, Gehirn , GIT, Lymphknoten Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten Haematopoetische Stammzellen Spermatozoen	Reovirus- Rezeptor Neutrophilen- u. T- Zelladhäsion Leukozytenmigration Thrombozytenaggregation Angiogenese in Verbindung mit basic fibroblast growth factor (bFGF)	LFA-1 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ $\sigma\text{-1}$ (Reovirus)
	Tight junctions, laterale Zellmembran		
JAM-B	Endothelzellen, bes. Herz Gehirn Niere Lymphknoten	Leukozytenadhäsion	JAM-C VLA-4
	gesamte laterale Zellmembran		
JAM-C	Plazenta, Leber, Hirn, Testes, Lymphknoten Retina Endothelzellen Leukozyten	Neutrophilenbindung u. Migration Thrombozytenadhäsion an Leukozyten	CD11b CD18
	Apikaler Teil der Zellmembran, mit desmosomalen Proteinen		

#### 1.4.1 Die Bausteine der JAMs

Wie bereits beschrieben, bestehen die JAMs aus unterschiedlichen Proteinmotiven, die teilweise weit verbreitet sind<sup>28</sup>.

Die C2 Domäne ist ein etwa 130 Aminosäuren umfassendes Proteinmodul. Sie wurde erstmals als Bestandteil der Proteinkinase C nachgewiesen<sup>29,30</sup>.

Eine PDZ Domäne ist ein ca. 90 Aminosäuren langer Proteinkomplex, der in zahlreichen Variationen vorkommt und bei Protein-Proteininteraktionen eine Rolle

spielt. Der Name wurde aus den Anfangsbuchstaben der ersten drei Proteine dieser Art gebildet, die Anfang der 1990er Jahre entdeckt wurden<sup>31</sup>. Bis jetzt sind im menschlichen Genom über 400 solcher PDZ Domänen bekannt<sup>32</sup>. Die verschiedenen Klassen (I-III) teilen sie nach der funktionellen Aktivität ein<sup>33</sup>.

Die Proteine JAM-A, -B, und -C zeigen mit einer Sequenzübereinstimmung von etwa einem Drittel einen hohen Verwandtschaftsgrad untereinander<sup>18</sup>. JAM-A enthält jeweils eine einzelne Disulfidbrücke in den Immunglobulin- Domänen, während JAM-B und -C jeweils zwei besitzen<sup>34</sup>.

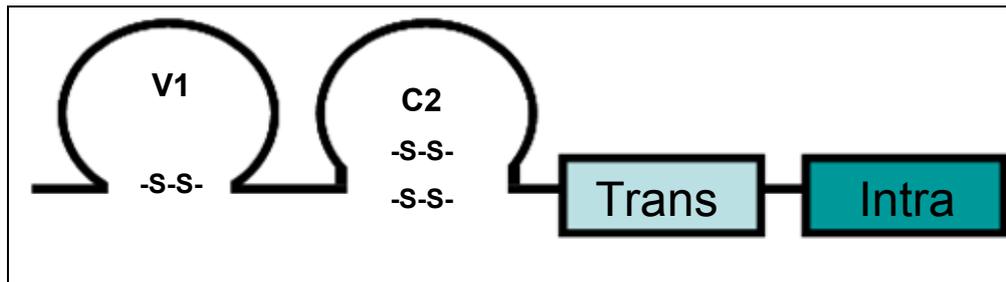


Abbildung 2: schematischer Aufbau eines JAM Proteins

#### 1.4.2 Bindungsverhalten und Bindungspartner

Genauere Analysen der Rezeptorstruktur der JAMs liegen momentan nur für JAM-A vor. Durch eine bestimmte Aminosäuresequenz (Val-Leu-Val), den so genannten „Linker“ stehen die beiden Domänen des JAM nicht senkrecht aufeinander, sondern sind seitlich aufeinander zugekippt<sup>36</sup>. Eine weitere Aminosäuresequenz, die als Bindungsstelle für ein anderes JAM dienen kann, (Arg-Val-Glu) ist jetzt so ausgerichtet, dass sie die Bindungsstelle eines anderen, ebenfalls gekippten JAMs binden kann<sup>37</sup>. Weil beide Moleküle aufeinander zu gekippt sind, wird diese Bindung als cis- Form bezeichnet. Diese cis- Homodimere können JAM- Homodimere auf einer anderen Zelle in trans- Form, also entgegengesetzt gekippt, binden<sup>37</sup>. Ähnliche Aminosäuresequenzen, wie die des JAM-A sind auch für JAM-B (Arg-Leu-Glu) und JAM-C (Arg-Ile-Glu) bekannt. Möglicherweise bilden JAM-B und -C auf ähnliche Weise Dimere, eventuell spielt dieser Mechanismus auch für die Bindung andere Moleküle eine Rolle<sup>34</sup>. JAMs gehen also untereinander molekulspezifisch (JAM-A/JAM-A, homophil) klassenspezifisch (JAM-B/JAM-C, heterophil) oder mit anderen Adhäsionsmolekülen Bindungen ein.

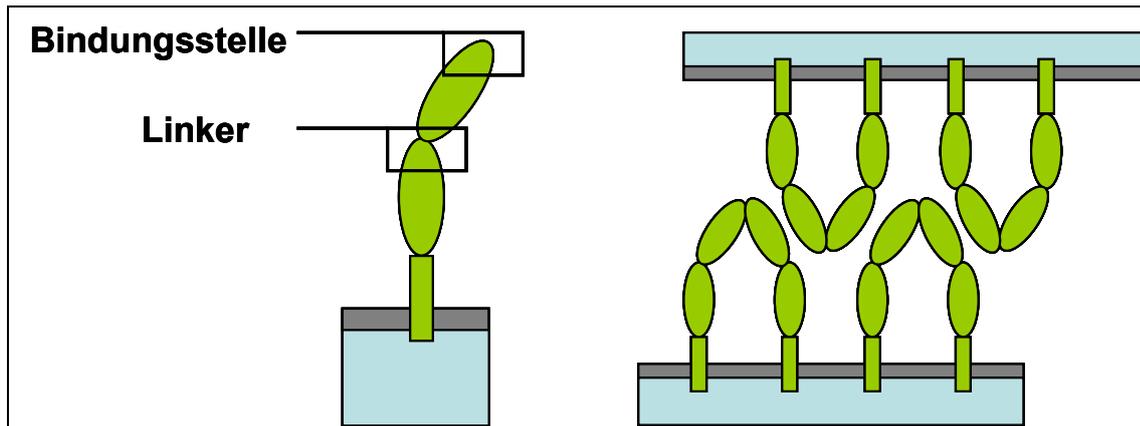


Abbildung 3: schematische Darstellung homo- und heterophiler JAM Interaktionen

### 1.4.3 Funktionelle Vielseitigkeit

Die homophilen Interaktionen der JAMs beeinflussen die Permeabilität von Epithel- und Endothelzellschichten und spielen deshalb bei entzündlichen Veränderungen eine wichtige Rolle<sup>38,39,40</sup>. Sie sind besonders an den Zell-Zellverbindungen, beispielsweise tight-junctions von Endothelzellen, von Bedeutung. Homophile JAM-A stabilisieren die Interzellularverbindungen und senken die Permeabilität<sup>41,42</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten Studien der JAM-C Expression in MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Zellen und in JAM-C defizienten Endothelzellen eine gesteigerte Permeabilität durch kompetitive Bindung und Destabilisierung von VE-Cadherin Bindungen<sup>43,44</sup>.

Sind die JAMs auf der luminalen Zelloberfläche vorhanden, können sie weitere, vielfältige Bindungen eingehen. Das Integrin LFA-1 bindet JAM-A<sup>45</sup>. JAM-B kann das Integrin VLA-4 binden, allerdings nur in Anwesenheit von JAM-C<sup>46</sup>. Beide Moleküle sind auf T-Zellen vorhanden und spielen eine Rolle für die hohe Affinität dieser Zellen für JAM-B<sup>12</sup>. JAM-C interagiert mit MAC-1<sup>46</sup>.

Auch als Kofaktoren bei der Aggregation von Thrombozyten spielen die Bindungen der JAMs eine Rolle. Peptide mit der gleichen Aminosäuresequenz wie membran- distales JAM-A konnten die Thrombozytenaggregation verhindern<sup>48</sup>, möglicherweise unterstützen homophile JAM-A die Adhäsion von Thrombozyten an Endothel<sup>34</sup>. An Integrine gebundenes JAM-C unterstützt die Bindung von Thrombozyten an Leukozyten<sup>47</sup>.

Die ersten Hinweise darauf, dass die JAMs Aufgaben bei der Extravasation und Transmigration übernehmen, wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen JAM-A von Mäusen gemacht<sup>38</sup>. Spätere Studien konnten außerdem zeigen, dass endothelständiges JAM-A die LFA-1 abhängige Transmigration von Neutrophilen und T-Zellen und die Adhäsion von Monozyten und T-Zellen unter Flussbedingungen beeinflusst<sup>45</sup>.

JAM-B nimmt Funktionen bei der Transmigration wahr. In einem Mausmodell für Kontaktdermatitis konnte ein Antikörper gegen JAM-B die entzündliche Reaktion vermindern<sup>49</sup>.

Auch für JAM-C ist eine Beteiligung an der Leukozyteneinwanderung belegt. Endothelzellen mit starker Überexpression von JAM-C bewirken eine verstärkte

Transmigration von Lymphozyten<sup>34</sup>. Entsprechend dazu wird dieser Prozess von einem Antikörper gegen JAM-C oder lösliches JAM-C vermindert<sup>50</sup>. JAM-C Antikörper waren auch in Entzündungsmodellen in vivo wirksam<sup>49,51</sup>.

## 1.5 Die T- Lymphozyten

Bis in die sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts hinein wurden die T- Lymphozyten wegen ihrer mikroskopisch unscheinbaren Gestalt als Immunzellen unbekannter Funktion bezeichnet<sup>52</sup>. Und tatsächlich besitzen „naive“, ungeprägte T- Zellen noch keine spezielle Aufgabe. Erst wenn die T-Lymphozyten auf ihr spezifisches Antigen treffen, treten sie in Aktion und stellen dann eine wichtige Verbindung zwischen dem gewebständigen und dem humoralen Immunsystem her. Auf dem Weg zum reifen T-Lymphozyt passieren sie Knochenmark, Thymus und Lymphknoten. Als reife Zelle können sie dann in das Gewebe auswandern. Zusätzlich sind sie in der Lage, mit zahlreichen Zellen des Immunsystems wie dendritischen Zellen und anderen Makrophagen oder B-Lymphozyten in Kontakt zu treten. Hierfür können T-Zellen zahlreiche Rezeptormoleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren und Zytokine sezernieren<sup>15</sup>.

### 1.5.1 T-Lymphozyten können zahlreiche Adhäsionsmoleküle exprimieren

Lymphatische Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark aus und reifen im Thymus zu naiven T-Zellen. Diese gelangen über die Blutbahn in periphere Lymphgewebe, wo sie mit Antigen präsentierenden Zellen (APC) in Kontakt treten. Sie müssen zuerst die Wände postkapillärer Venolen durchwandern, sog. high endothelial venules (HEV). Selektine, die auf naiven T-Zellen exprimiert werden, weisen hier den Weg über Bindung an sulfatisierte Lewis<sup>x</sup> Anteile von GlyCAM-1 und CD34, die auf den Endothelzellen vorhanden sind<sup>15,17</sup>. Dies sind die so genannten Adressine der peripheren Lymphknoten, zusätzlich spielt hier noch die Bindung LFA-1/ ICAM-1 eine Rolle<sup>53</sup>. Innerhalb des lymphatischen Gewebes binden die T-Zellen dann reversibel an die APC, und zwar durch LFA-1, CD2 und ICAM-3 auf der T-Zelle und ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 und DC-SIGN (CD209) auf der APC<sup>54</sup>. Während dieser relativ festen Bindungsphase tastet die T-Zelle die APC auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen ab. Ist dieses vorhanden, wird die naive T-Zelle aktiviert. Hierzu ist ein Komplex aus MHC Klasse II Molekül, T-Zellrezeptor, CD4 und weiteren costimulatorischen Faktoren notwendig<sup>55</sup>. Durch die Aktivierung der T-Zelle ändert sich das Expressionsmuster ihrer Oberflächenmoleküle. So steigt nach Aktivierung die Expression von LFA-1, CD2, CD4 und VLA-4 an.

Außerdem produzieren aktivierte T- Zellen eine Reihe von Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ <sup>12</sup>. Auch gewebsspezifische Oberflächenmarker, die für die Auswanderung der T-Zellen in das Zielgewebe, sogenanntes Homing, von Bedeutung sind, werden ausgebildet.

Bestimmte T-Lymphozyten, die in die Haut auswandern, bilden cutaneous lymphocyte antigen (CLA)<sup>56</sup>. Dessen Ligand E-Selektin wird vom Endothel

entzündeter, postkapillärer Venolen, besonders in der Haut, ausgebildet<sup>57,58</sup>. Weiter oben wurde bereits beschrieben, dass Selektine den ersten Schritt bei der nun folgenden Auswanderung der T-Zellen in das Gewebe spielen.

## 1.6 Die Endothelzellen

Durch ihre Lokalisation direkt an der Kontaktstelle zwischen Blut und Gewebe kommt den Endothelzellen eine besondere Aufgabe beim Austausch von Zellen oder Nährstoffen zwischen diesen beiden Kompartimenten zu. Je nach Gewebe und Erfordernissen ist diese Barriere mehr oder weniger permeabel.

### 1.6.1 Endothelzellen bilden eine Barriere

In wie weit Immunzellen sie passieren können, hängt von verschiedenen Faktoren ab. T-Lymphozyten benötigen für die Transmigration sowohl laminare Strömung als auch eine adäquate Zytokinstimulation<sup>59</sup>. Die Endothelzellen werden ebenfalls von den Leukozyten und ihren Metaboliten beeinflusst. So sind  $\beta$ -Integrine als deren Oberflächenmoleküle an der Modulation der Permeabilität beteiligt<sup>60</sup>.

AMP aus dem Neutrophilenstoffwechsel erhöht die Durchlässigkeit der Endothelzellschicht *in vitro*<sup>61</sup>. Auch Glutamat, Heparin-Bindungs-Protein und Enzyme wie Elastase können diesen Effekt herbeiführen<sup>62,63,64</sup>.

Auf molekularer Ebene kann dies verschiedene Ursachen haben. Monozyten verändern bei der Durchwanderung von Endothelzellschichten die Anordnung bestimmter Proteinkomplexe (VE-Cadherin), die um die zonulae adhaerentes gruppiert sind<sup>65</sup>. Ein ähnlicher Vorgang wurde auch für ein anderes Molekül beschrieben (PECAM-1), jedoch wurden hier über das Verhalten widersprüchliche Aussagen gemacht<sup>66</sup>. Möglicherweise entstehen durch diese Umlagerung oder durch enzymatische Spaltung Löcher in den Interzellularverbindungen, die von den Leukozyten für die Transmigration genutzt werden<sup>67,68</sup>.

### 1.6.2 JAMs sind auf Endothelzellen unterschiedlich lokalisiert

Die Expression der JAMs auf verschiedenen Geweben wurde bereits weiter oben beschrieben. Über die Lokalisation der einzelnen Mitglieder auf der Oberfläche von Endothelzellen ist Folgendes bekannt.

JAM-A befindet sich an der lateralen Zellmembran, besonders in dem Bereich, der dem Gefäßlumen zugewandt ist. Hier kann es mit bestimmten Proteinen assoziiert sein, die für die Integrität der tight-junctions von Bedeutung sind (z.B. ZO-1)<sup>43,69</sup>. Unter bestimmten Bedingungen ist es auch auf der lumenseitigen Zellmembran zu finden<sup>70</sup>.

JAM-B ist an verschiedenen Stellen entlang der lateralen Zellmembran verteilt. Möglicherweise ist es für die Integrität der tight-junctions von Bedeutung<sup>43</sup>. Es kann zudem ebenfalls mit dem tight-junction Protein ZO-1 und auch mit PAR-3 assoziiert

sein, einem Protein, das für die Zellpolarität wichtig ist<sup>26</sup>. Auf aktiviertem Endothel kann es allerdings auch auf der lumenseitigen Zellmembran gefunden werden<sup>71</sup>. Auch JAM-C wird unter bestimmten Umständen auf der apikalen Membran ausgebildet<sup>34</sup>. Befindet es sich auf der lateralen Membran, kann es mit desmosomalen Proteinen assoziiert sein<sup>72</sup>.

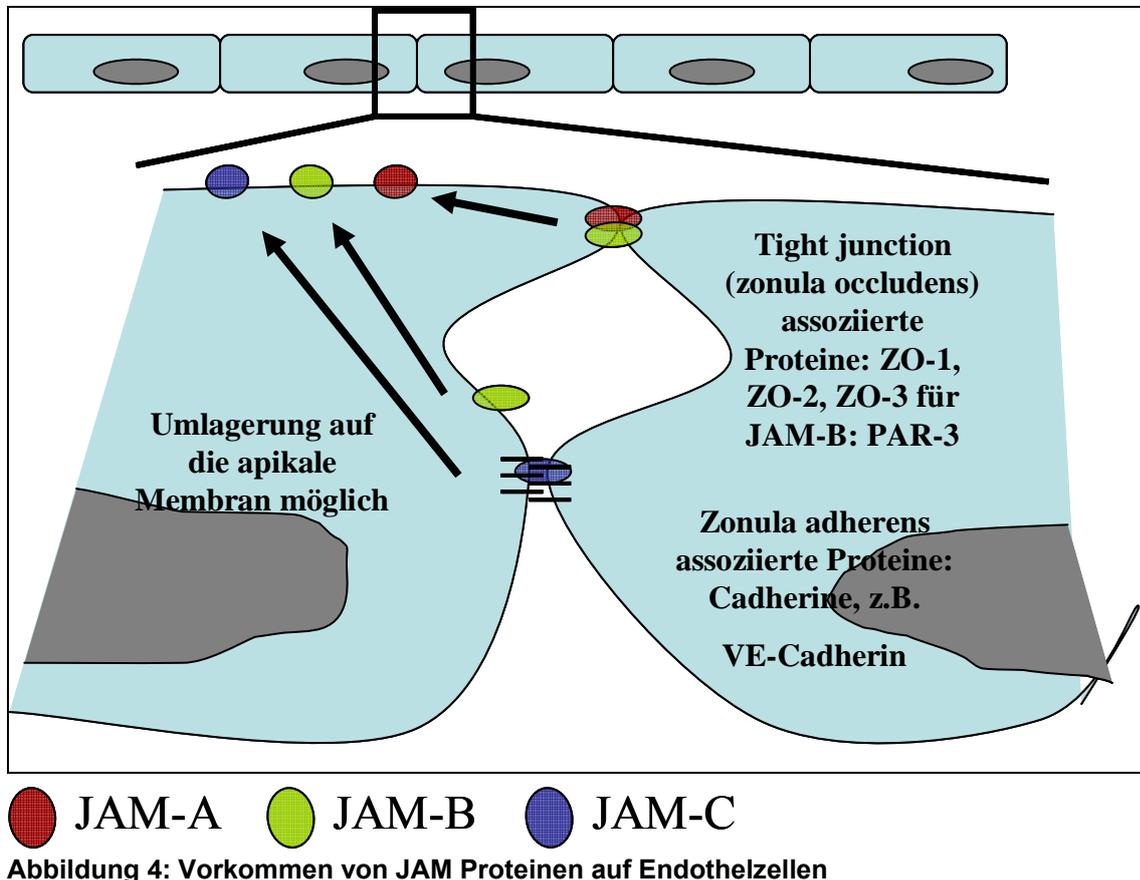


Abbildung 4: Vorkommen von JAM Proteinen auf Endothelzellen

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung von JAM-B an den frühen Schritten der Extravasation, Capturing, Rolling und Adhäsion zu charakterisieren und mögliche Bindungspartner auf der Lymphozytenoberfläche zu identifizieren.

Es kamen Flusskammersysteme zur Anwendung, um eine Beobachtung unter dynamischen Bedingungen zu gewährleisten. Mit Antikörpern wurden mögliche Bindungspartner des JAM-B auf den T-Lymphozyten oder JAM-B selbst auf Endothelzellen blockiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Zellen

HUVEC: Fa. Promocell/ Heidelberg No.: C-12200  
 T-Lymphozyten: Buffy coat DRK Blutspendedienst Frankfurt, Germany

#### Proteine

JAM B Protein: rh JAM 2-FC Chimera 1 Fa. R&D Systems Wiesbaden, Germany  
 TNF $\alpha$ : Fa. Cell Concepts Umkirch, Germany rh TNF $\alpha$

#### Antikörper

Anti JAM C: goat IgG anti human Fa. R&D  
 Anti  $\beta$ 1 (CD 29): Mouse IgG 1 Fa. Acris Hiddenhausen, Germany  
 Anti VLA-4: Mouse IgG 1 anti human Klone 2b4 Fa. R&D  
 Isotyp JAM-C: goat IgG whole molecule Fa. Dianova  
 Isotyp JAM-B: Mouse IgG 2a Fa. Dianova Hamburg, Germany  
 JAM B: Anti human VE-JAM Antibody IgG goat extracellular domain Fa. R&D Systems Wiesbaden, Germany  
 Immunfluoreszenz: Alexa Fluor 488 rabbit anti goat Fa. Invitrogen Corporation Carlsbad, Ca USA

#### Reagenzien

AIM V Medium liquid Gibco Fa. Invitrogen Corporation Carlsbad, Ca USA  
 Ammoniak 33% Fa. Merck, Darmstadt, Germany  
 Ammoniumchlorid Fa. Merck, Darmstadt, Germany  
 Aqua ad injectabile Fa. Delta Select Pfullingen, Germany  
 Biocoll Separating Solution (Ficoll separating solution) Fa. Biochrom Berlin Germany  
 Borsäure Fa. Merck, Darmstadt, Germany  
 BSA Albumin bovine Fraction V Fa. Serva Heidelberg, Germany  
 BSA-Lösung BSA Fraction V Gibco 7,5% Fa. Invitrogen Corporation Carlsbad, Ca USA  
 Chloroform, wasserfrei 99% Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany  
 Cyanurchlorid 99% Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany  
 EDTA Gibco 0,5 M pH 8,0 Fa. Invitrogen Corporation Carlsbad, Ca USA  
 NaOH Natriumhydroxid (Natronlauge) 1Mol/L Fa. Merck, Darmstadt, Germany  
 FCS 100% Gibco Fa. Invitrogen Corporation Carlsbad, Ca USA  
 HEPES Gibco 1M Fa. Invitrogen Corporation Carlsbad, Ca USA  
 Kaliumhydrogencarbonat Fa. Merck, Darmstadt, Germany  
 NaEDTA Fa. Merck, Darmstadt, Germany  
 PBS-Puffer +/- (ohne Ca, Mg) Fa. PAA Laboratories, Pasching, Germany  
 PBS-Puffer +/+ (mit Ca, Mg) Fa. PAA Laboratories, Pasching, Germany

Salzsäure 37%	Fa. Merck, Darmstadt, Germany
Schwefelsäure 95-98%	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Trypsin Gibco 2,5%	Fa. Invitrogen Corporation Carlsbad, Ca USA
Türks-Lösung	Fa. Merck, Darmstadt, Germany
Wasserstoffperoxid 30%	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Germany

### Mischungen

#### Lysingpuffer

	1Liter H <sub>2</sub> O
	Ammoniumchlorid 8,26g
	Kaliumhydrogencarbonat 1,00g
	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat 0,037g

#### T- Zellpuffer

	500 ml PBS -/-,
	2,1 ml EDTA 0,5 M,
	37,5 ml BSA 7,5%

#### T- Zellmedium

	AIM V Medium liquid
	5% FCS

### HUVEC- Medium

EGM 2% FCS	Fa. Clonetics
ECBM 2% FCS	Fa. Promocell

### Geräte

Auflichtmikroskop Olympus CKX 41	Fa. Olympus Hamburg, Germany
----------------------------------	------------------------------

#### Fluoreszenzmikroskopie

Kamera	Nikon COOLPIX 995	Fa. Nikon, Düsseldorf, Germany
Lichtquelle	Olympus U-RFL-T	Fa. Olympus Hamburg, Germany
Mikroskop	Olympus BX 50	Fa. Olympus Hamburg, Germany
Perfusor	Perfusor Secura FT,	Fa. Braun, Heidelberg, Germany
Pipetten 5-100 ml	Automatic Sarpette	Fa. Sarstedt Nümbrecht, Germany
Pipetten 5-1000µl	Eppendorf Reference	Fa. Eppendorf Hamburg, Germany
Sterilwerkbank	Microflow	Fa. Nunc Wiesbaden Germany
Wasserbad	Emmi 30 Eco	Fa. EMAG Mörfelden-Walldorf, Germany
Zellkultur		Fa. Leitz, Wetzlar Germany
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Fa. Heraeus Hanau Germany

**Statistik:** SigmaStat 3.5

**Verbrauchsmaterial**

μ Slide I:	Fa. IBIDI GmbH Integrated BioDiagnostics Martinsried Germany
Falcon- Röhrchen 15ml/ 50 ml	Fa Greiner Frickenhausen, Germany
MACS Pan T-cell isolation kit human	Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
MACS separation columns	Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany
Paralell plate flow chamber kit	Fa. GlycoTech, Gaithersburg USA
Pipetten Costar Stripette	Fa. Corning Incorporated, Corning NY, USA
Pipettenspitzen. TipOne	Fa. Starlab Ahrensburg, Germany
Zellkultur- Flaschen	Fa. Nunc Wiesbaden Germany

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von Leukozyten

Die T-Lymphozyten wurden aus Buffycoats gewonnen. Diese fallen bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten an und sind sehr leukozytenreich. Aus den Buffycoats wurden PBMC (peripheral blood mononuclear cells) mit Hilfe der Dichtegradientenmethode gewonnen.

**Tabelle 7: Arbeitsanleitung Leukozytenextraktion**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Zellmaterial suspendieren	Buffy coat 100 ml PBS -/-	mit ca. in einem Becherglas suspendieren
Auftrennen in die Bestandteile	3 50ml Falcon Röhrchen mit Fritte 15 ml Separating solution  Ca. 35 ml Zell- Pufferlösung	mit jeweils füllen und kurz abzentrifugieren (Flüssigkeit befindet sich danach unter der Fritte) Oberhalb der Fritte einbringen, zentrifugieren 2000 rpm, 15 min, Raumtemperatur (RT)
Abtrennen der Lymphozyten	50 ml Falcon Röhrchen PBS -/-	Überstand über dem weißen Lymphozytenring abnehmen, dann diesen, auf 2 neue verteilen und mit auffüllen. Zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 18°C)
Erythrozytenlyse	25 ml Erythrozyten-Lysingpuffer	Überstand abgießen, Zellpellets in einem Röhrchen vereinen und mit versetzen, 5 min. im Kühlschrank inkubieren, dann Zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 6-12°C)
Waschen	PBS -/-	Überstand abgießen, Zellpellet lösen, mit auf 50 ml auffüllen und vorsichtig mischen, zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 6-12°C) Schritt wiederholen.
Zellzahl einstellen	40 ml T- Zellpuffer	Überstand abgießen, Zellpellet lösen, mit Suspendieren, die Zellen zählen ( z.B. mit Neubauer Zählkammer), währenddessen zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 6-12°C)
	T- Zellpuffer	Überstand abgießen, Zellpellet lösen, mit So auffüllen, dass die Zellkonzentration 10 hoch 8/ml entsteht

## 2.2.2 Isolation der T-Lymphozyten

Aus der Leukozytenpopulation wurden gezielt die T-Lymphozyten in Negativisolation extrahiert. Der verwendete Antikörper bindet alle Zellen, außer T- Zellen.

Es werden mit Antikörpern beladene magnetische Kügelchen verwendet, sog. beads. Die Antikörpersuspension enthält Antikörper gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, und CD235a (Glycophorin A). Diese sind an Biotin gebunden. Beads besitzen auf der Oberfläche Biotinantikörper. Setzt man diese Lösung in der Trennsäule einem Magnetfeld aus, so werden alle an Antikörper und Beads gebunden Zellen zurückgehalten, lediglich die T- Zellen können passieren.

**Tabelle 8: Arbeitsanleitung Extraktion von T-Lymphozyten**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Antikörperbindung an PBMC	1 ml der PBMC Suspension 15 ml Falcon Röhrchen  800 µl T- Zellpuffer 200 µl Hapten Antibody cocktail	in ein geben, zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 18°C) und in aufnehmen, mit versetzen und inkubieren (10 min bei 6-12°C) dann zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 18°C)
Waschen	PBS -/-	Überstand abgießen, Zellpellet lösen, mit auf 15 ml auffüllen und vorsichtig mischen, zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 6-12°C) Schritt wiederholen.
Beadbindung an Antikörper-PBMC-Komplexe	800 µl T- Zellpuffer 200 µl Beads	Überstand abgießen, Zellpellet lösen, mit und versetzen und inkubieren (10 min bei 6-12°C) ) dann zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 6-12°C)
Waschen	PBS -/-	Überstand abgießen, Zellpellet lösen, mit Auf 15 ml auffüllen und vorsichtig mischen, zentrifugieren (1100 rpm, 8min., 6-12°C) Schritt wiederholen.
Trennen der T-Zellenfraktion aus dem Leukozytengemisch	Trennsäule  1 ml T- Zellpuffer  10 ml T- Zellpuffer	in den Magneten einsetzen und mit spülen, dann insgesamt mit etwa die gelösten Zellen mögl. vollständig auf die Trennsäule überführen, Zellen zählen.
Kultivieren der T- Zellen	T- Zell- Medium	Die Zellen vollständig In eine Zellkulturflasche überführen, mit Soweit auffüllen, dass die Zellkonzentration $10^6$ /ml entsteht

### 2.2.3 Kultivierung der HUVEC Zellen

Es wurden gefrorene HUVEC Zellen verwendet. Für jeden Versuch wurden einige Zellen entnommen, über mehrere Tage vermehrt und anschließend auf die Objektträger aufgebracht.

**Tabelle 9: Arbeitsanleitung HUVEC Kultivierung**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Auftauen der Zellen	Kryoröhrchen mit HUVEC Wasserbad 37°C  1ml HUVEC- Medium	in einem vorgeheizten schnell auftauen, noch im Röhrchen sofort mit suspendieren
Kultivieren der Zellen	HUVEC Zellen Zellkulturflasche HUVEC- Medium	streng steril in eine geben und mit 200µl/cm <sup>2</sup> auffüllen

### 2.2.4 Pflege der Zellen in der Kulturflasche (ZK)

**Tabelle 10: Arbeitsanleitung: HUVEC Pflege**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Verbrauchtes Medium entnehmen	   10 ml PBS +/-	Flüssigkeit vorsichtig aus der Zk- Flasche abgießen, mit vorsichtig nachspülen
Neues Medium einfüllen	HUVEC- Medium FCS 100%	Aus und eine 5% FCS- Lösung herstellen und die entsprechende Menge (200µl/cm <sup>2</sup> ) vorsichtig in die ZK- Flasche geben

## 2.2.5 Separieren der Zellen

Die HUVEC teilen sich in Kultur und bilden so nach und nach auf dem Boden der Kulturflasche einen Zellrasen. Diese feste Adhäsion muss gelöst werden, um die Zellen auf dem Trägerslide anzusiedeln.

**Tabelle 11: Arbeitsanleitung HUVEC Separation**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Medium entnehmen	10 ml PBS -/-	Flüssigkeit vorsichtig aus der Zk- Flasche abgießen, mit vorsichtig nachspülen
Zellen ablösen -Calcium binden	3 ml EDTA 0,02%	Mit gut spülen, den Zustand der Zellen am Auflichtmikroskop überwachen, ca. 5 min. inkubieren, Überstand abgießen, sammeln
Zellen ablösen -Zellkontakte trennen -Zellen aus der Flasche entfernen	1,5 ml EDTA 0,02% 1,5 ml Trypsin 0,125%  FCS 30% HUVEC- Medium	Eine Mischung aus Und in die ZK- Flasche geben, 3 min. inkubieren, leicht schwenken dann in gleicher Menge und Verhältnis und einfüllen, schwenken, Überstand abgießen, sammeln
Waschen	5 ml HUVEC- Medium	Überstand zentrifugieren (1100 rpm 7min) und in aufnehmen
Ausbringen	IBIDI Slide  Brutschrank, 37°C 5% CO2	Jeweils 1 ml Suspension auf ein geben, Anschließend die Slides im(Vorsicht: in der Kammer dürfen keine Luftblasen entstehen!) inkubieren, so lagern, dass Luft auch von unten zirkulieren kann

## 2.2.6 Pflege der Zellen auf dem Slide

Bis auf dem Trägerslide ein homogener Zellrasen entstanden ist, können einige Tage vergehen. Das Nährmedium muss in dieser Zeit gewechselt werden.

**Tabelle 12: Arbeitsanleitung HUVEC Nährmediumwechsel**

Arbeitsschritt	Benötigt	Vorgehen
Wechsel des Nährmediums	1 ml HUVEC- Medium	In das eine Reservoir des Slides einfüllen. Auf der anderen Seite die gleiche Menge Flüssigkeit entnehmen

### 2.2.7 Flusskammer mit Proteinbeschichtung

Für die Versuche mit proteinbeschichteten Glasplättchen (Slides) wurde eine Flusskammer der Firma GlycoTech verwendet. Am Zulauf der Kammer wurde ein Perfusor über einen Kunststoffschlauch angeschlossen. Dazwischen wurde ein Dreiwegehahn geschaltet. Der Perfusor war mit HEPES Medium gefüllt und erzeugte einen kontinuierlichen Fluss in der Kammer. Am anderen Ende der Kammer führte ein zweiter Schlauch die verbrauchte Flüssigkeit ab. Der dritte Schlauch war mit einer Vakuumpumpe verbunden, die durch Unterdruck für den festen Kontakt zwischen Glasslide und Flusskammer sorgte. Über den Dreiwegehahn wurde mittels einer Einmalspritze jeweils 1ml Zellsuspension pro Versuch zugegeben. Der Versuch fand unter einem Auflichtmikroskop mit einem 10-fach Objektiv statt. Mit einer digitalen Videokamera wurden ca. 30 Sekunden lange Filmsequenzen aufgezeichnet, und zwar 30 Sekunden nach der Injektion der Zellen, nach 6 Minuten und nach 12 Minuten. Diese Filme dienten später zur Auswertung.

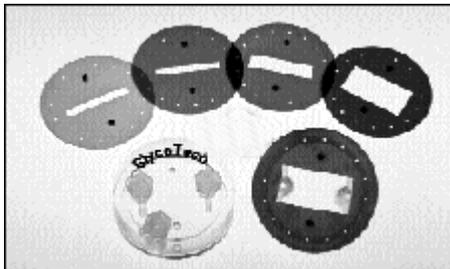


Abbildung 5: Glyco Tech Flusskammersystem

### 2.2.8 Berechnung des Scherkraft

Mit Hilfe der festen Daten der Flusskammer (Länge des Kanals, Breite) und Kenntnis des Viskositätskoeffizienten für das Medium, wurde die Flussrate des Perfusors so eingestellt, dass Scherkräfte (shearstress) von  $0,2 \text{ dyn/cm}^2$  herrschten. Um Randeffekte zu vermeiden, wurden die Filmsequenzen ausschließlich in der Mitte der Kammer aufgenommen.

Berechnung des shearstress  $\tau$  [ $\text{N/ m}^2$ ]

$$\tau = \frac{6 \cdot \eta \cdot Q}{(w \cdot h^2)}$$

$\eta$ : Viskositätskoeffizient [ $\text{Pa} \times \text{sec.}$ ] (Wasser  $20^\circ\text{C}$ :  $1,002 \times 10^{-3}$ )

Q: Durchfluss [ $\text{l/ sec}$ ]

w: Breite [m]

h: Höhe [m]

### 2.2.9 Aufbereitung der T-Lymphozyten am Versuchstag

Am Versuchstag wurden die T-Lymphozyten mit monoklonalen Antikörpern inkubiert. Diese waren gerichtet gegen VLA-4,  $\beta$ 1-Integrin oder JAM-C, jeweils 1  $\mu$ g/ml Zellsuspension. Bei der Kombination der VLA-4 und  $\beta$ 1 Antikörper wurden diese Konzentrationen beibehalten. Isotypkontrollen wurden in gleicher Konzentration bzw. im Kombinationsversuch mit 2  $\mu$ l/ml Zellsuspension durchgeführt.

**Tabelle 13: Arbeitsanleitung Aufbereitung T-Lymphozyten**

Arbeitsschritt	Benötigt	Vorgehen
Zellen vom Medium trennen	Falcon Röhrchen 50 ml PBS -/-	Den Inhalt der ZK- Flasche in ein überführen. Mit Auf 50 ml auffüllen, Zellen zählen. Zentrifugieren (1100 rpm 8 min. RT)
Zellkonzentration einstellen	T-Zellpuffer	Mit so auffüllen, dass die Zellkonzentration $10^6$ /ml beträgt
Zellen mit Antikörper beladen	Falcon Röhrchen 15 ml gelöstem Antikörper  1,5 ml T-Zellpuffer	mit 1,5 ml der Zellsuspension füllen und mit versetzen. Inkubieren (1 Std. 37°C) Zentrifugieren (1100 rpm 8 min. RT) und mit resuspendieren, sofort verbrauchen

## 2.2.10 Reinigung der Glasslides

Um die Voraussetzungen für die Bindung von JAM B Protein an die Glasoberfläche zu schaffen, wurden mehrere Wasch- und Aufbereitungsschritte durchgeführt. Ziel war, auf der Glasoberfläche eine Schicht Cyanurchlorid zu erhalten, um später das Protein daran binden zu können.

**Tabelle 14: Arbeitsanleitung Vorbereitung der Glasträger**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Entfernung von Rückständen auf dem Glas	10 Slides Becherglas 70 ml Konz. Schwefelsäure 95 % 30 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	in das geben und mit und versetzen. Im Ultraschallbad für 30 min. bei 80 °C inkubieren. Anschl. Flüssigkeit abgießen
waschen	50 ml Aqua dest.	in das Becherglas geben. Slides darin schwenken. Wasser wieder abgießen. 10 mal wiederholen
Freilegen der OH- Gruppen	20 ml konz. Ammoniak 20 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100 ml Aqua dest.	Eine Mischung aus  In das Becherglas geben und mit den Slides für 30 min. im Ultraschallbad bei 80°C inkubieren
waschen	50 ml Aqua dest.	in das Becherglas geben. Slides darin schwenken. Wasser wieder abgießen. 10 mal wiederholen
trocknen	Slides und Becherglas	Im Trockenschrank bei 60°C
Beschichtung mit Cyanurchlorid	Becherglas Chloroform Cyanurchlorid Slides	In dem gesättigte Lösung aus und ansetzen, die dazugeben und im Ultraschallbad 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren. Flüssigkeit abgießen.
waschen	Chloroform	Becherglas zur Hälfte mit füllen und im Ultraschallbad 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren. Flüssigkeit abgießen.
trocknen	Slides	Bei Raumtemperatur trocknen

### 2.2.11 Beschichtung mit JAM-B Protein

Auf der Glasoberfläche wurde eine homogene Schicht JAM-Protein gebunden. Durch die Vorbehandlung wurde sichergestellt, dass das Protein auch unter den Bedingungen der Flusskammer auf dem Glas haftet.

**Tabelle 15: Arbeitsanleitung Aufbringen der Proteinbeschichtung**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Herstellen der Pufferlösung	100 ml Aqua dest. 68,5 mg Borat	mit suspendieren
	NAOH HCL 0,5% BSA- Protein (500mg)	Mit wenigen Tropfen oder den pH Wert auf 8,8 einstellen zugeben und unter Rühren auflösen
Lösung des Proteins	lyophilisiertes JAM-B Aqua dest. (50µg in 100µl)	mit suspendieren
Herstellen der Proteinlösung	1 ml Boratpuffer 2,5µg (5µl)gelöstes JAM Protein	Unmittelbar vor Gebrauch und suspendieren auf das Slide geben und für 2 Stunden inkubieren

### 2.2.12 Immunfluoreszenz

Die Beobachtungen in der Flusskammer und damit die Aussagen über JAM-B setzten voraus, dass ausreichend Protein an die Glasoberfläche gebunden hatte. Zum Nachweis wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Im Sinne einer Sandwich Methode wurde ein Antikörper gegen JAM-B mit einem Fluoreszenzantikörper gekoppelt. Durch den Vergleich von beschichteten zu unbeschichteten Slides mit entsprechender Fotodokumentation wurde JAM-B auf der Glasoberfläche nachgewiesen.

**Tabelle 16: Arbeitsanleitung Immunfluoreszenz**

Arbeitsschritt	benötigt	Vorgehen
Vorbereitung	gereinigtes und mit JAM Protein beschichtetes Slide Petrischale PBS	in eine kleine Geben, und mehrmals vorsichtig mit spülen (Slide darf nicht trocknen!)
Primärantikörperauftrag	gelösten Antikörper	auf das Slide geben, inkubieren
Waschen	PBS	mit waschen, dann
Sekundärantikörperauftrag	gelösten Antikörper	auf das Slide geben, inkubieren
Waschen	PBS	mit waschen unter entsprechendem Mikroskop beurteilen

### 2.2.13 Flusskammer mit HUVEC

Um die Rolle von JAM B bei der Adhäsion von T-Zellen an Endothel zu untersuchen, wurde ein Flusskammersystem der Firma IBIDI verwendet. In den Objektträger ist ein Kanal eingelassen, die Enden sind offen. Der Kanal ist innen mit Kollagen beschichtet. Die Slides wurden mit Zu- und Ablaufschlauch versehen, unter dem Mikroskop platziert wobei eine Infrarot-Wärmequelle für gleich bleibende Temperatur sorgte.

Als Flussmedium wurde AIM V Gibco (2%FCS) verwendet, das am Zulauf in einem Reservoir bereit stand. In einem zweiten Reservoir wurden die T- Zellsuspension eingefüllt, mittels eines Schalters konnte entweder Medium oder Zellsuspension in das Zulaufsystem gegeben werden.

Am Ablauf war ein Perfusor angebracht, der durch Unterdruck für gleichbleibenden Fluss sorgte. Der Sog des Perfusors wurde so eingestellt, dass in der Flusskammer ein shearstress von  $0,2 \text{ dyn/cm}^2$  herrschte (Berechnung nach bereits beschriebener Formel).



**Abbildung 6: Flusskammersystem IBIDI**

Am Versuchstag wurden die HUVEC auf dem Objektträger mit TNF $\alpha$  400 IU/ml eine Stunde vor Versuchsbeginn im HUVEC Medium (2%FCS) stimuliert. Vor Versuchsbeginn wurde JAM-B Antikörper 1 $\mu\text{g/ml}$  in die Flusskammer eingebracht. Die Kontrollen blieben hierbei unbehandelt, bzw. wurden in gleicher Weise mit Isotypantikörper versetzt.

### 2.2.14 Mikroskopie und Filmaufzeichnung

Zu festgelegten Zeitpunkten wurden Videosequenzen aufgezeichnet, die später für die Auswertung herangezogen wurden.

**Tabelle 17: Protokoll Filmaufzeichnung**

Minute 0	Start Zellen	
Minute 4		Start Film 1
Minute 6	Stopp Zellen	
Minute 9		Stopp Film 1
Minute 11		Start Film 2
Minute 10		Stopp Film 2
Minute 14:15		Start Film 3
Minute 14:45		Stopp Film 3
Minute 16	Ende	Bilder zur Auswertung

### 2.2.15 Auswertung der Filme

Die Auswertung der Filme wurde am Computerbildschirm vorgenommen. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden hierzu drei Parameter ausgewertet.

Rolling: Auf den Bildschirm wurde eine Maske aufgeklebt, die ein 5x5 cm großes, quadratisches Fenster enthielt. In diesem Fenster wurden für jeweils 10 Sekunden die rollenden Zellen gezählt, und zwar jeweils einmal am Anfang, in der Mitte und am Ende des Films. In jeder Filmsequenz wurde an drei unterschiedlichen Stellen des Bildschirms gezählt, und das in jedem der drei Filme eines Versuchsdurchganges, sodass pro Versuch 27 Messwerte entstanden.

Die Maße des Kameraausschnittes waren bekannt. Daraus konnte dann über die Bestimmung des 5x5 cm Quadrates die Zellzahl pro  $\text{mm}^2$  pro sec errechnet werden.

Rolling velocity: Es wurde eine Schablone mit einem Fenster der Größe 3x10 cm auf den Bildschirm geklebt, und zwar so, dass die lange Seite des Rechtecks parallel zur Flussrichtung der Zellen war.

Per Zufall wurde die Filmsequenz gestoppt, und die Zelle, die sich am nächsten zum Rand des Fensters und am deutlichsten in der Fenstermitte befand, zur Geschwindigkeitsmessung ausgewählt. Gemessen wurde die Zeit, die die Zelle benötigt um die definierte Strecken zurückzulegen. Daraus wurde die Geschwindigkeit errechnet. Auf diese Weise wurden 60 Zellen pro Versuch ausgewertet.

Sticking: Am Ende des letzten Filmes eines Versuches wurden die haftenden Zellen pro Bildschirm ausgezählt. Hierzu wurden die letzten 10 Sekunden des Filmes abgespielt, um sicher zwischen rollenden und adhärenen Zellen unterscheiden zu können. Über die bekannte Abmessung des Kameraausschnitts konnte die Zellzahl pro  $\text{mm}^2$  errechnet werden.

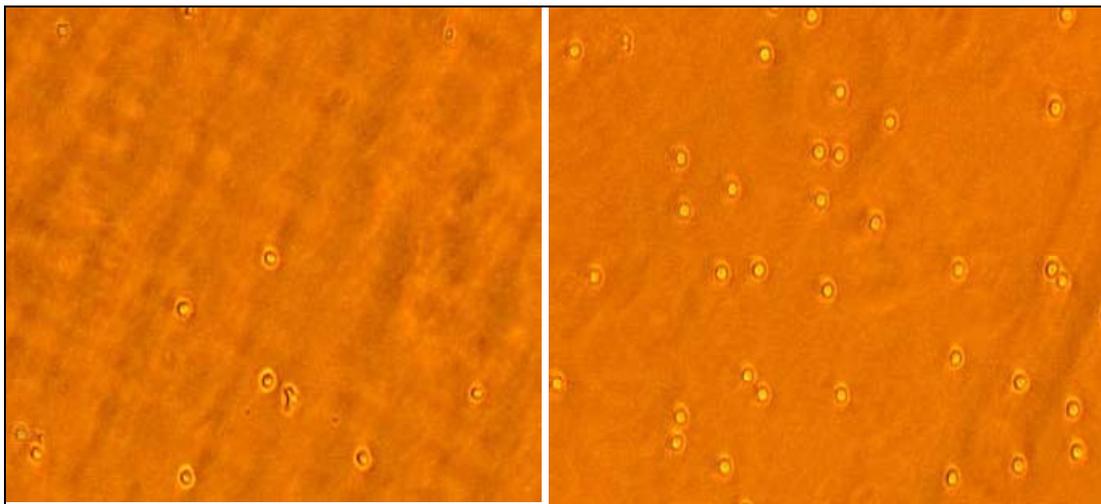
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung von JAM-B an den frühen Schritten der Extravasation, Capturing, Rolling und Adhäsion zu charakterisieren und mögliche Bindungspartner auf der Lymphozytenoberfläche zu identifizieren. Zur Quantifizierung wurden drei Parameter betrachtet. Als dynamische Größen die Zahl auf der Oberfläche rollenden Zellen pro Zeit (Rolling) und deren Geschwindigkeit (Rolling Velocity). Am Ende jedes Versuchs wurde die Zahl der fest an der Oberfläche anhaftenden Zellen (Sticking) bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten in einem dynamischen System mit JAM-B interagieren können, und zwar deutlich mehr als mit einer unspezifischen Proteinmatrix. Dies ließ sich auch für die Anhaftung der Zellen an JAM-B zeigen. Durch die Blockade des Integrins VLA-4 kam es zu einer Abnahme der rollenden Zellen. Gleiches gilt für die alleinige Blockade der Integrinuntereinheit  $\beta 1$  mittels Antikörper, hier erhöhte sich zusätzlich die Geschwindigkeit der rollenden Zellen. Eine gemeinsame Behandlung mit beiden Antikörpern erbrachte keine zusätzlichen Effekte. Die Anzahl der anhaftenden Zellen vermochte allerdings nur diese Kombination beider Antikörper zu senken.

Wurde eine Endothelzellschicht mit einem JAM-B Antikörper behandelt, nahm die Zahl der rollenden Zellen ab und deren Geschwindigkeit zu. Die Zahl adhärenter Zellen änderte sich nicht.



**Abbildung 7: Flusskammer mit Proteinbeschichtung: geringe und hohe Zellzahl nach 10 Minuten**

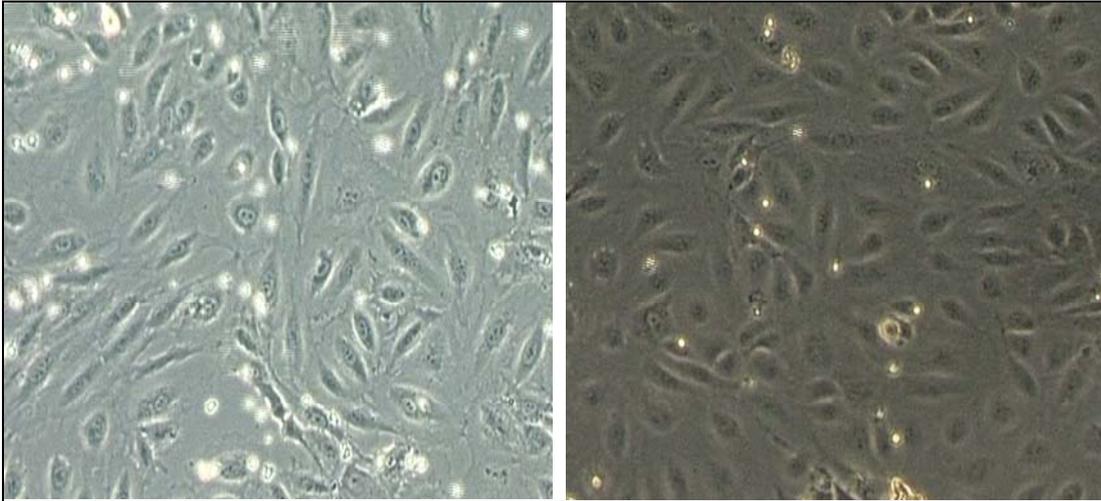


Abbildung 8: Flusskammer mit HUVEC: hohe und geringe Zellzahl nach 10 Minuten

### 3.2 JAM-B lässt sich auf einer Glasoberfläche fixieren und bildet eine homogene Schicht

Zur Prüfung, ob sich JAM-B Protein wie angestrebt auf der Glasoberfläche fixieren lässt, wurden JAM-B auf einzelnen Slides mit Immunfluoreszenz nachgewiesen. Der fluoreszenzmarkierte Antikörper ist spezifisch für JAM-B, die Kontrolle mit BSA-Beschichtung ließ sich nicht anfärben.

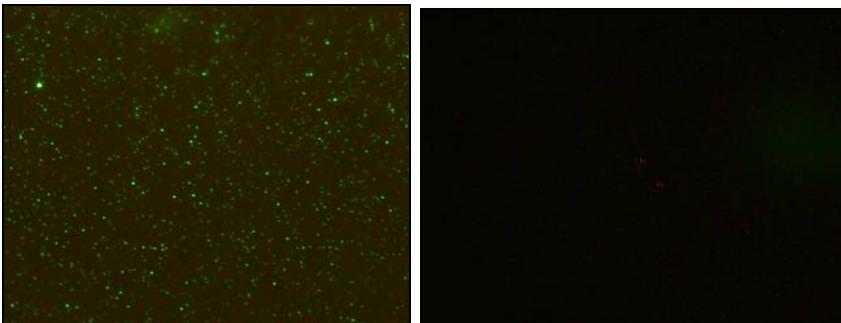


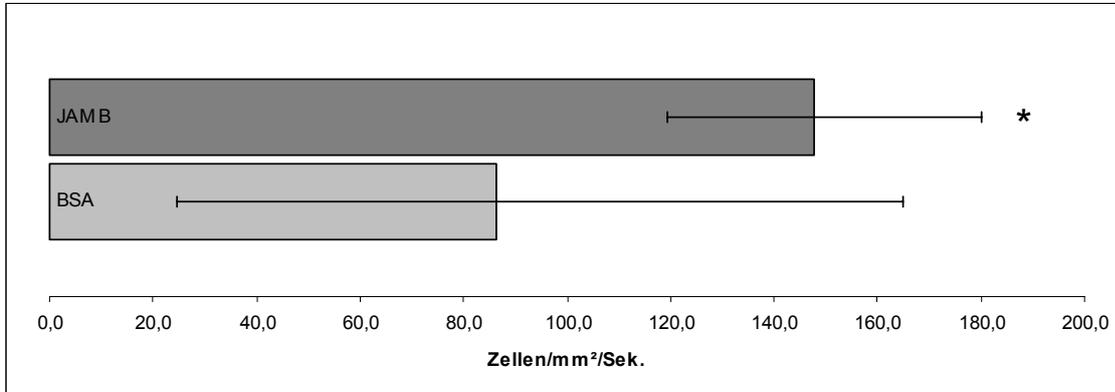
Abbildung 9: fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von JAM-B vs. Kontrolle

### 3.3 T-Lymphozyten rollen auf einer JAM-B beschichteten Oberfläche

Um die Beteiligung von JAM-B am Rolling von T-Lymphozyten zu charakterisieren, wurden diese Zellen über ein mit JAM-B Protein beschichtetes Glasslide perfundiert. Mit Hilfe des vorher beschriebenen Versuchsaufbaus wurde in der Kammer ein kontinuierlicher Fluss mit einem shearstress von  $0,2 \text{ dyn/ cm}^2$  erzeugt. Es wurden Videosequenzen des Versuchs aufgezeichnet und zur Auswertung herangezogen. Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Zelle herauszurechnen, wurde ein Kontrollexperiment mit einem BSA-beschichteten Slide

durchgeführt, und dieses unspezifische Rolling mit dem bei JAM-B Beschichtung verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass auf der JAM-B beschichteten Oberfläche signifikant mehr Zellen rollten. Dies deutet darauf hin, dass T-Lymphozyten auch unter dynamischen Bedingungen direkt mit JAM-B in Kontakt treten können.

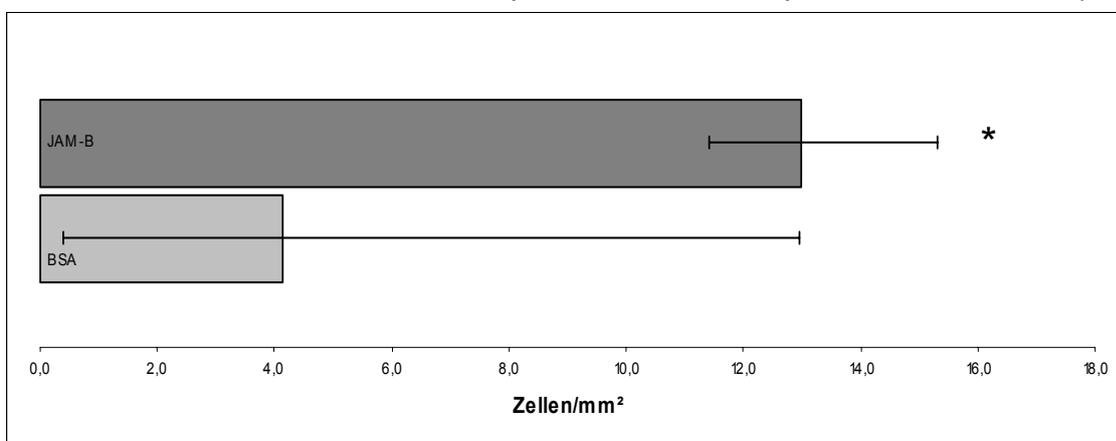


**Abbildung 10: Ergebnis Zellrolling JAM-B vs. Kontrolle**

Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der rollenden Zellen pro  $\text{mm}^2$  und Sekunde. Während die mittlere Anzahl rollender Zellen bei der BSA-Beschichtung ( $n=8$ ) bei 86,4 (+78,4/ -61,8) lag, war sie bei der JAM-B Oberfläche ( $n=8$ ) mit 147,9 (+32,2/-28,4) signifikant erhöht (\* $p=0,0036$ ). Der Fehlerindikator zeigt die höchste, bzw. niedrigste gemessene Zellzahl aller Stichproben. Die Auswertung erfolgte mittels unpaired t- Test.

### 3.4 Auf einer JAM-B beschichteten Oberfläche adhären T-Lymphozyten bevorzugt

Am Ende jeder Stichprobe wurde die Anzahl der adhären Zellen pro Fläche ermittelt. Es zeigte sich, dass an der JAM-B Oberfläche deutlich mehr Zellen adhären waren als in den Kontrollexperimenten mit unspezifischem Protein (BSA).



**Abbildung 11: Ergebnis Zelladhäsion JAM-B vs. Kontrolle**

Auf JAM-B adhärirten durchschnittlich 13,0 Zellen/mm<sup>2</sup> (+2,3/- 1,6), deutlich mehr als auf BSA mit 4,1 Zellen/mm<sup>2</sup> (+8,8/- 3,8), (jeweils n=8), (\*p< 0,05). Die Auswertung erfolgte mittels t- Test. Es bestätigte sich also die hohe Affinität der T-Lymphozyten zu JAM-B.

### 3.5 Ein Antikörper gegen $\beta 1$ Integrin und ein VLA-4 Antikörper vermindern das Rolling von T-Lymphozyten auf JAM-B

Es konnte gezeigt werden, dass JAM-B das Rolling von T-Lymphozyten fördert. Um die beteiligten Moleküle auszumachen, wurden auf den T- Zellen einmal das komplette Integrin VLA-4 mit einem Antikörper geblockt. In weiteren Versuchen wurde nur die  $\beta 1$  Untereinheit des VLA-4 blockiert und das Rolling wie oben beschrieben quantifiziert.

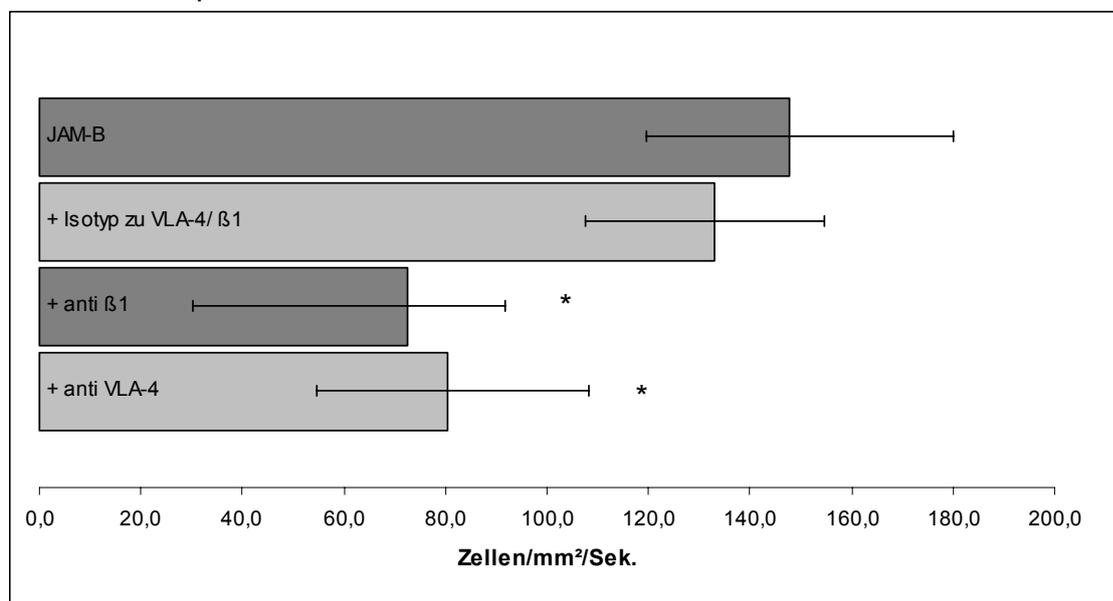


Abbildung 12: Ergebnis Zellrolling nach Antikörperblockade von  $\beta 1$  oder VLA-4

Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der rollenden Zellen pro mm<sup>2</sup> und Sekunde. Die Blockade von VLA-4 auf T- Zellen (n=7) senkt das Rolling auf JAM- B signifikant auf 80,6 Zellen (+27,5/ -25,9) im Vergleich zum Experiment ohne Antikörper (\*p < 0,001). Auch im Vergleich zur Isotypkontrolle (n=7) sank das Rolling signifikant (\*p < 0,001). Die Blockade der  $\beta 1$  Untereinheit senkt das Rolling ebenfalls signifikant auf 72,5 Zellen (+19,4/ -42,3), (\*p< 0,001).

Dies gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass VLA-4 mit JAM-B interagieren kann. Möglicherweise wird die Bindung von VLA-4 und JAM-B über die  $\beta 1$  Untereinheit des VLA-4 vermittelt. Die Möglichkeit von Bindungen zwischen JAM-B und VLA-4 sind ja bereits bekannt, sie scheinen aber auch in der frühen Phase der Extravasation eine Rolle zu spielen. Der Fehlerindikator zeigt die höchste, bzw. niedrigste gemessene Zellzahl aller Stichproben. Die Auswertung erfolgte mittels one way ANOVA.

### 3.6 Die Kombination von VLA-4 und $\beta 1$ spezifischen Antikörpern haben keinen additiven Effekt im Vergleich zur Einzelgabe

Wenn die  $\beta 1$  Untereinheit des VLA-4 die Bindung zu JAM-B vermittelt, sollte eine Blockade von VLA-4 und  $\beta 1$  in Kombination keinen zusätzlichen Effekt auf das Rolling haben.

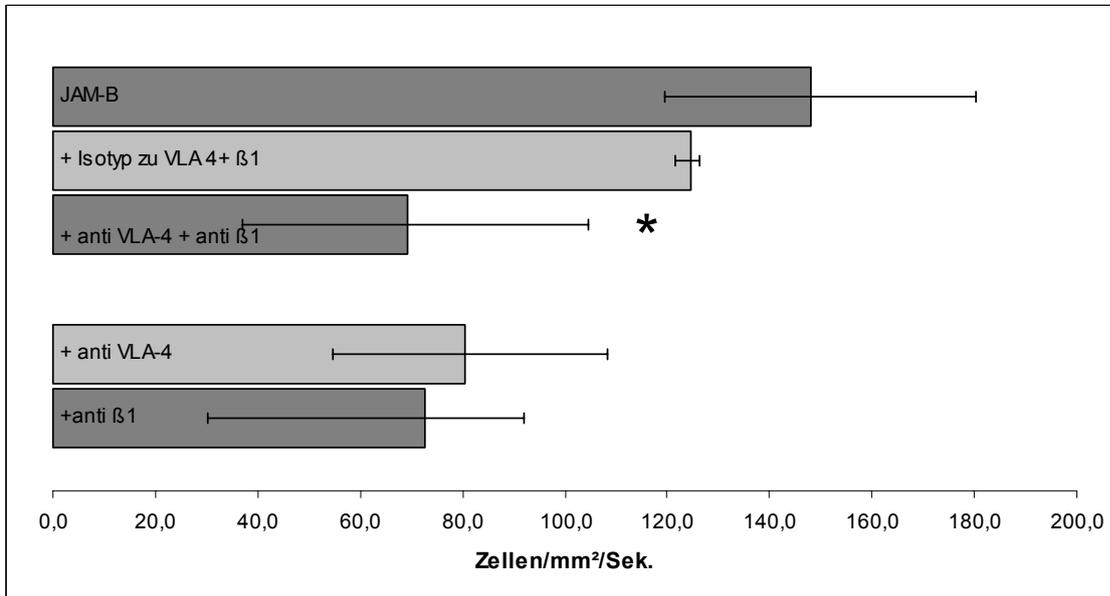


Abbildung 13: Ergebnis Zellrolling nach Antikörperblockade von  $\beta 1$  oder VLA-4

Die Abbildung zeigt die mittlere Anzahl der rollenden Zellen pro  $\text{mm}^2$  und Sekunde. In diesen Versuchen ( $n=5$ ) reduzierte sich das Rolling auf 69,4 Zellen (+35,1/- 32,4), was sowohl signifikant zum Experiment ohne Antikörper ( $*p < 0,001$ ) als auch zur Isotypkontrolle war ( $*p < 0,05$ ). Im Vergleich zur Blockade von VLA 4 oder  $\beta 1$  wurde keine Signifikanz erreicht ( $p > 0,05$ ). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die  $\beta 1$  Untereinheit des VLA 4 die Bindung zu JAM-B vermittelt (und nicht die eines anderen Moleküls). Der Fehlerindikator zeigt die höchste, bzw. niedrigste gemessene Zellzahl aller Stichproben. Die Auswertung erfolgte mittels one way ANOVA.

### 3.7 Die Blockade von $\beta 1$ Integrin erhöht die Geschwindigkeit der rollenden Zellen

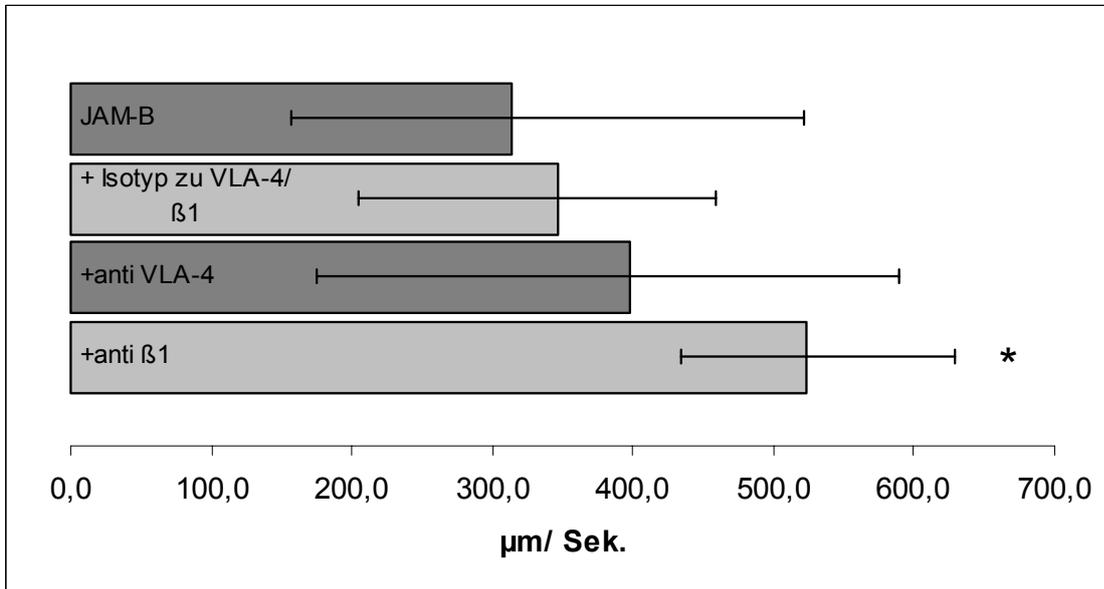
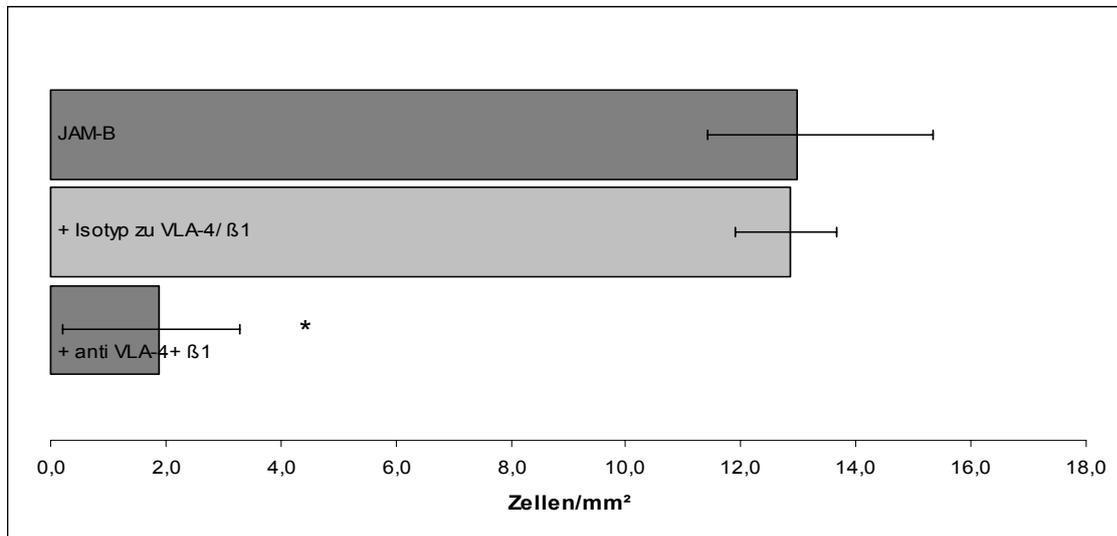


Abbildung 14: Ergebnis Rollgeschwindigkeit bei Blockade von  $\beta 1$  Integrin

Die Gabe eines Antikörpers gegen  $\beta 1$  Integrin erhöht die Geschwindigkeit der auf JAM-B rollenden T- Zellen im Vergleich zum Experiment ohne Antikörper signifikant. Die mittlere Geschwindigkeit ohne Antikörper betrug  $312 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$  ( $+209,0/-156,9$ ) und wird durch Blockade von  $\beta 1$  auf  $522,9 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$  ( $+105,6/-88,4$ ) gesteigert ( $*p < 0,05$ ). Bezogen auf die Isotypkontrolle war diese Steigerung nicht signifikant. Auch mit einem VLA-4 Antikörper wurde keine signifikante Steigerung der Geschwindigkeit gemessen. Die Kombination beider Antikörper führte aber wiederum zur Steigerung der Geschwindigkeit auf  $507,0 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$  ( $+124,1/-118,8$ ), die im Vergleich zur Kontrolle ohne Antikörper signifikant war ( $p < 0,05$ ). Die Auswertung erfolgte mittels one way ANOVA.

### 3.8 Die Blockade von VLA-4 und $\beta 1$ vermindert die Zahl adhärenter T-Lymphozyten auf JAM-B



**Abbildung 15: Ergebnis Zelladhäsion bei Blockade von VLA-4 und  $\beta 1$**

Die Blockade von VLA-4 und  $\beta 1$  auf T-Zellen senkt die Anzahl der adhärenter Zellen auf JAM-B signifikant. Bei gleichzeitiger Gabe beider Antikörper ( $n = 4$ ) liegt diese im Mittel bei 1,9 Zellen/mm<sup>2</sup> (+1,4/- 1,7) und damit deutlich unter der Zahl ohne Antikörpergabe (\* $p < 0,001$ ). Auch im Vergleich zur Isotypkontrolle mit 12,9 Zellen/mm<sup>2</sup> (+0,8/- 1,0) besteht Signifikanz (\* $p < 0,001$ ), was physikalische Effekte allein durch die Antikörperbeladung der Zellen unwahrscheinlich macht. Allein konnte weder die VLA-4- noch die  $\beta 1$ -Blockade mit Antikörper die Adhäsion signifikant senken, möglicherweise durch die kompensatorische Wirkung anderer Adhäsionsmoleküle, die erst unter statischen Bedingungen aktiv werden. Die Auswertung erfolgte mittels one way ANOVA.

### 3.9 JAM-C hat keinen Einfluss auf das Rolling von T-Lymphozyten

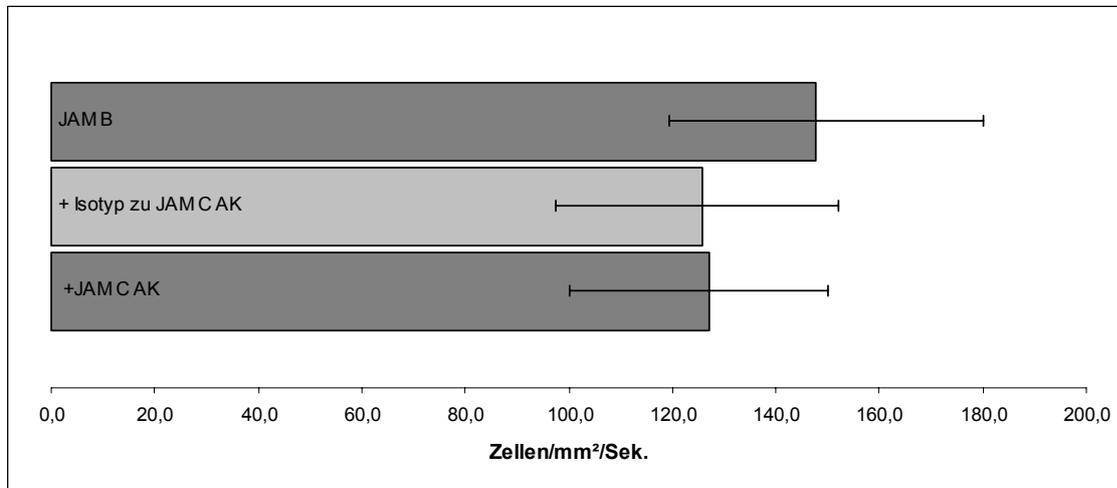


Abbildung 16: Ergebnis Zellrolling bei JAM-C Blockade

Die Behandlung der T-Lymphozyten mit einem monoklonalen Antikörper gegen JAM-C hat keinen Einfluss auf das Rolling dieser Zellen. In diesen Versuchen (n=4) konnte kein Unterschied zu den Kontrollen ohne, bzw. mit Isotypantikörper gemessen werden. Ähnlich fielen die Ergebnisse auch für die Rolling Velocity und die Zahl der adhärennten Zellen aus (Daten nicht aufgeführt). Möglicherweise sind die Kontakte zwischen T-Zelle und JAM-B unabhängig von JAM-C.

### 3.10 Relevanz von JAM-B für Interaktionen von Endothelzellen und T-Lymphozyten

Diese Experimente sind insofern artifizuell, als das Verhalten von T-Zellen auf isolierten Adhäsionsmolekülen untersucht wurde. Um der physiologischen Situation näher zu kommen, wurden gleichartige Experimente unter Verwendung von Zellrasen aus HUVEC anstelle der isolierten Adhäsionsmoleküle wiederholt.

Um interindividuellen Unterschieden und einer möglichen Aktivierung der Zellen bereits im Spender Rechnung zu tragen, wurde ein Leerexperiment ohne Antikörper durchgeführt, und die Änderungen bei Antikörperblockade relativ zu diesem betrachtet.

### 3.11 Ein JAM-B Antikörper vermindert Rolling von T-Lymphozyten

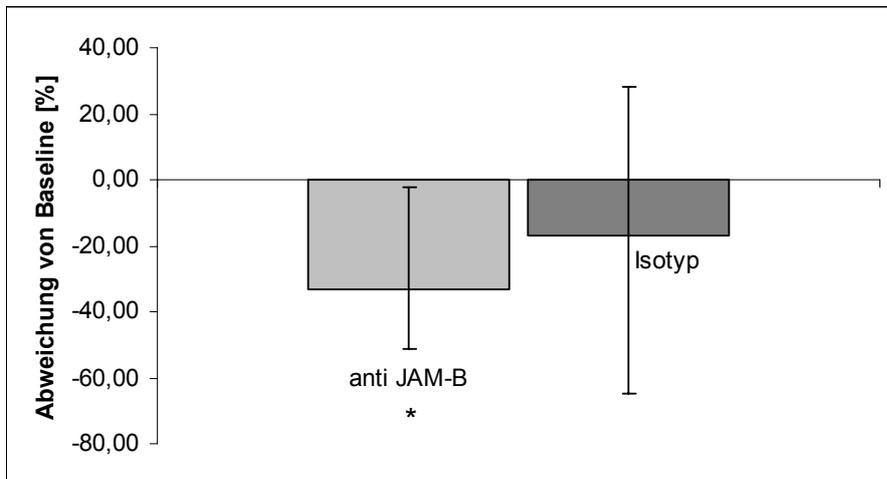


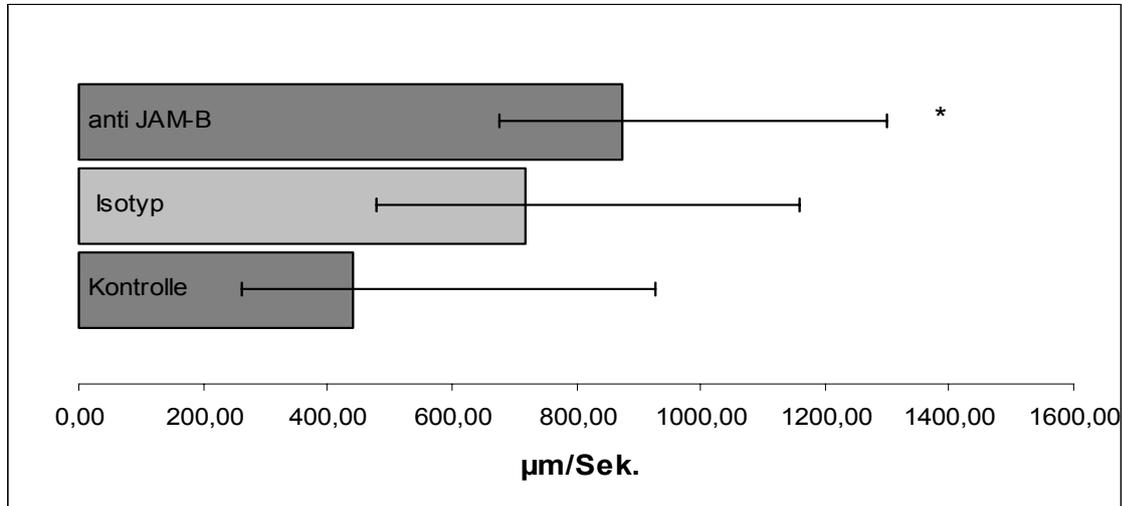
Abbildung 17: Ergebnis Zellrolling bei JAM-B Blockade auf HUVEC

Die Anzahl der rollenden Zellen pro Fläche und Zeit wird durch die Inhibition von JAM-B auf Endothelzellen im Vergleich zur Leerprobe (n= 8) signifikant (\*  $p < 0,02$ ) gesenkt. In einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{g/ml}$  (n=6) senkte der Antikörper das Rolling auf 66,73% (+30,86/ -17,59 Prozentpunkte). Der Isotypantikörper (n=4) in gleicher Konzentration senkt das Rolling nicht signifikant auf 83,22% (+44,76/ -48,25 Prozentpunkte). Im Vergleich zum Isotypantikörper ging das Rolling bei JAM-B Blockade zwar zurück, diese Änderung erreichte jedoch kein signifikantes Niveau. Eine höhere Antikörperkonzentration führte zu einem abnehmenden Effekt (Daten nicht aufgeführt).

Das Diagramm zeigt den mittleren Anteil der rollenden Zellen bezogen auf die Leerprobe der jeweiligen Stichprobe. Der Fehlerindikator gibt den höchsten bzw. niedrigsten gemessenen relativen Anteil aller Stichproben wieder.

Die Auswertung erfolgte mit ANOVA on ranks.

### 3.12 Ein JAM- B Antikörper erhöht die mittlere Rollgeschwindigkeit von T-Lymphozyten



**Abbildung 18: Ergebnis Rollgeschwindigkeit bei JAM-B Blockade auf HUVEC**

Die Blockade des membranständigen JAM-B von HUVEC- Endothelzellen erhöhte die durchschnittliche Rollgeschwindigkeit der darüber perfundierten T- Zellen im Vergleich zum Leerexperiment signifikant.

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der rollenden Zellen wurde durch die Inhibition von JAM-B auf Endothelzellen signifikant (\*  $p < 0,02$ ) erhöht. In den Leerproben ( $n=8$ ) erreichten die Zellen nur eine durchschnittliche Geschwindigkeit von  $441,42 \mu\text{m}/\text{sek.}$ , der Antikörper in einer Konzentration von  $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $n=6$ ) steigerte die Geschwindigkeit auf  $874,80 \mu\text{m}/\text{sek.}$  In der Isotypkontrolle ( $n=4$ ) war die Geschwindigkeit erhöht ( $717,51 \mu\text{m}/\text{sek.}$ ), dies ist im Vergleich zur Leerprobe nicht signifikant. Höhere Antikörperkonzentrationen erbrachten keinen zusätzlichen Effekt. (Daten nicht aufgeführt).

Das Diagramm zeigt die mittlere Geschwindigkeit der rollenden Zellen aus allen Stichproben. Der Fehlerindikator gibt die höchste bzw. niedrigste Durchschnittsgeschwindigkeit aller Stichproben an. Die Auswertung erfolgte mit ANOVA on ranks.

### 3.13 Ein JAM-B Antikörper hat keinen Einfluss auf die feste Adhäsion von T-Lymphozyten

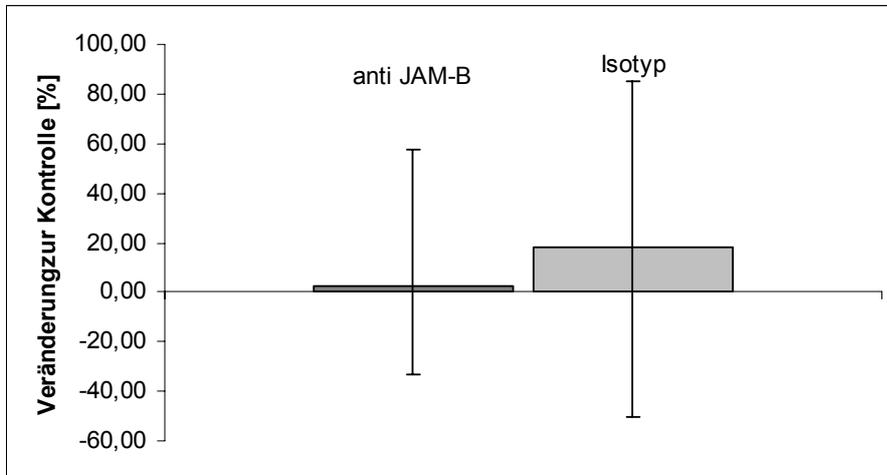


Abbildung 19: Ergebnis Zelladhäsion bei JAM-B Blockade auf HUVEC

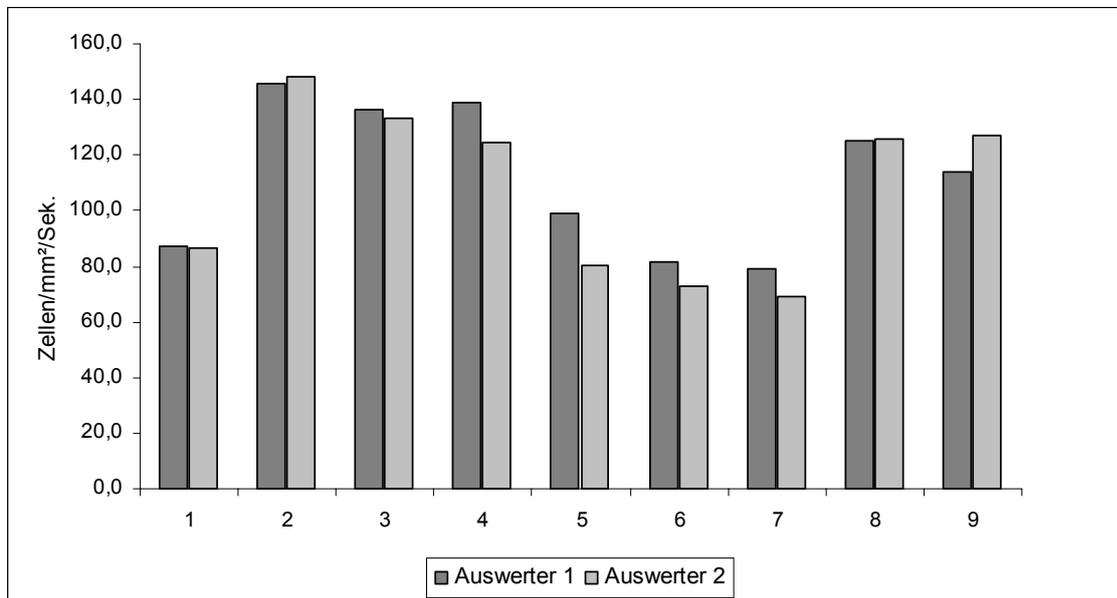
Die Blockade von JAM-B auf Endothelzellen hat keinen Einfluss auf die feste Adhäsion der Zellen.

Relativ zur Leerprobe adhärten bei einer JAM-B Antikörperkonzentration von 0,01 µg/µl durchschnittlich 102,77% Zellen (+54,55/ -35,74 Prozentpunkte). Die Isotypkontrolle erhöhte die Anzahl der adhären Zellen auf im Mittel auf 117,78% (+67,07/ -68,33 Prozentpunkte).

Das Diagramm zeigt den mittleren Anteil der adhären Zellen bezogen auf die Leerprobe der jeweiligen Stichprobe. Der Fehlerindikator gibt den höchsten bzw. niedrigsten gemessenen relativen Anteil aller Stichproben wieder. Die Auswertung erfolgte mit einer ANOVA on ranks.

### 3.14 Die Auswertungsergebnisse sind unabhängig vom Untersucher

Zur Gewinnung der Ergebnisse mussten die Filmsequenzen jedes Versuchs am Computerbildschirm analysiert werden. Der Untersucher ermittelte hierbei die Geschwindigkeit zufällig ausgewählter Zellen und bestimmte die Anzahl rollender Zellen in verschiedenen Bildausschnitten zu definierten Zeitpunkten. Die Ergebnisse sollen möglichst unabhängig von subjektiven Einflüssen des Untersuchers sein. Deshalb wurden die Ergebnisse verschiedener Untersucher verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Untersucher mit der verwendeten Methode zu annähernd gleichen Ergebnissen kamen. Exemplarisch sind hier zwei Ergebnisse für rollende T-Lymphozyten auf JAM-B beschichteter Oberfläche dargestellt.



Nummer des Versuchs	Behandlung der T-Lymphozyten
1	-, nur Beschichtung mit BSA
2	-, nur Beschichtung mit JAM-B
3	+ Antikörper Isotyp VLA-4/ $\beta$ 1 1 $\mu$ g/ml
4	+ Antikörper Isotyp VLA-4/ $\beta$ 1 2 $\mu$ g/ml
5	+Antikörper VLA-4 1 $\mu$ g/ml
6	+Antikörper $\beta$ 1 1 $\mu$ g/ml
7	+Antikörper VLA-4 + $\beta$ 1 je 1 $\mu$ g/ml
8	+Antikörper Isotyp JAM-C 2 $\mu$ g/ml
9	+Antikörper JAM-C 2 $\mu$ g/ml

Abbildung 20: Ergebnis Vergleich zweier Untersucher bei gleichem Versuch

## 4 Diskussion

### 4.1 Flusskammersysteme als Modelle für menschliche Blutgefäße

In menschlichen Blutgefäßen wirken durch Blutfluss und Blutdruck Kräfte auf die dort vorhandenen Zellen ein. Der Blutdruck bzw. der Füllungszustand des Gefäßes sorgt für eine nach außen gerichtete Kraft. Die in Richtung des Blutflusses wirkende Kraft ist tangential zum Gefäßlumen ausgerichtet. Diese wird auch als Schubspannung (Shear-Flow) bezeichnet, sie erzeugt Scherkräfte (Shear-Stress) entlang der Endothelzellschicht. Diese kann Auswirkungen auf das Verhalten der Endothelzellen selbst und der Leukozyten, die mit diesen in Kontakt treten, haben. Aus diesem Grund werden bei Experimenten *in vitro*, die sich mit Extravasation beschäftigen, Flusskammersysteme mit einer kontinuierlichen Strömung verwendet.

Vor den 1990er Jahren wurden die meisten Experimente *in vitro*, die sich mit Zelladhäsion beschäftigten, unter statischen Bedingungen durchgeführt. Dies steht klar im Widerspruch zu dem normalen physiologischen Umfeld der Blutgefäße, in denen die Extravasation stattfindet<sup>73</sup>. Obwohl die physikalischen Verhältnisse in diesem System noch nicht bis ins Detail geklärt sind, nimmt man einen gleichmäßigen Fluss mit einem parabolischen Geschwindigkeitsprofil an<sup>74</sup>. Dieser laminare Fluss treibt die Leukozyten und Thrombozyten in den Randbereich dieser Strömung, wo sie mit den Endothelzellen der Gefäßwand in Kontakt treten können. Die Erythrozyten befinden sich in der Mitte des Lumens und verdrängen die Leukozyten in die Randbereiche. Um diese Gegebenheiten experimentell nachzuahmen, wurden Flusskammersysteme entwickelt und die erhobenen Daten waren oftmals konform mit denen aus Versuchen *in vivo*, wie etwa der Intravitalmikroskopie<sup>73</sup>. Trotzdem sind diese Modelle nur unvollkommen, da die Erythrozyten, Thrombozyten und das Blutplasma fehlen, was Einflüsse auf die Viskosität des Flussmediums hat.

### 4.2 Zellen reagieren auf Shear-Stress

Nicht nur die physikalischen Gegebenheiten innerhalb des Blutgefäßes, auch die Zellen selbst werden vom Shear-Stress beeinflusst. Neben Thrombozyten und Erythrozyten, die sensibel gegenüber den unter Strömungsbedingungen wirkenden Kräften sind, ist bekannt, dass auch Endothelzellen hierdurch stimuliert werden können. So wird durch kontinuierlichen Fluss über Endothel die Transkription vieler Gene in diesen Zellen verändert<sup>75</sup>. Auch die Sekretion gefäßaktiver Substanzen wie Prostacyclin oder NO (Stickstoffmonoxid) werden durch den Shear-Stress

beeinflusst<sup>73</sup>. Neben den beschriebenen Zelltypen sind natürlich auch die Leukozyten den Flussbedingungen in den Blutgefäßen ausgesetzt und werden möglicherweise hierdurch beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten vermehrt Pseudopodien ausbilden und an der Gefäßwand adhären. Bei Beendigung des Flusses änderte sich auch der Zustand der Neutrophilen innerhalb von Minuten, bei Fehlen von extrazellulärem Kalzium blieben die Veränderungen ganz aus<sup>76</sup>. Andernorts wurde beobachtet, dass für die Transmigration bestimmter T-Lymphozyten in vitro neben Zytokinstimulation ein laminarer Shear-Flow essentiell ist<sup>77</sup>. Durch diese Beobachtungen lassen sich zwar keine generellen Aussagen über den Einfluss von Shear-Stress auf Leukozyten machen. Ebenso sind die Mechanismen, die die Zellen zur Wahrnehmung des Flusses befähigen, weitestgehend unbekannt. Es wird aber deutlich, wie komplex verschiedenen Faktoren Einfluss auf die Leukozytenadhäsion haben und, dass Shear-Stress ein wesentlicher Teil hiervon ist.

### **4.3 Gewinnung der Ergebnisse**

Wenn Experimente unter dynamischen Bedingungen durchgeführt werden müssen, stellt sich generell das Problem der Auswertung der Rohdaten, weil sie unmittelbar unter den Versuchsbedingungen erfolgen muss und keinen Raum lässt für aufwändige quantitative oder qualitative Methodik. Um trotzdem die Möglichkeit einer zweizeitigen Trennung von Experiment und Auswertung zu haben, wurden Filmsequenzen oder Bilder unmittelbar während des Experimentes aufgezeichnet und für die Ergebnisgewinnung herangezogen. Für die Bewertung von Bild- und Filmmaterial ist jedoch nach wie vor das menschliche Auge unerlässlich, allerdings mit der Folge einer möglicherweise subjektiven Beeinflussung der Ergebnisse. Dies trifft nicht nur auf Flusskammer oder intravitalmikroskopische Experimente zu, sondern auch auf zahlreiche Arbeiten, die Entzündungsinfiltrate nach histologischer Aufarbeitung auswerten. Es wird deshalb häufig ein genau definiertes Vorgehen bei der Bewertung vom Untersucher verlangt oder versucht, durch das Benutzen von Scores die Ergebnisfindung objektiver zu machen<sup>49</sup>.

Die Auswertung wurde sowohl beim Flusskammermodell mit Proteinbeschichtung als auch bei den HUVEC Experimenten manuell durchgeführt. Um eine möglichst hohe Objektivität zu sichern, wurden die Zellen zufällig ausgewählt, bzw. die Beobachtungsfelder für alle Versuchsbedingungen gleich gewählt. Es wurden zudem die Ergebnisse verschiedener Auswerter verglichen, wobei sich eine große Übereinstimmung bezüglich der Ergebnisse zeigte.

## 4.4 Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass JAM-B auch in der frühen Phase der Extravasation von Leukozyten, dem tethering und rolling, von Bedeutung sein kann. Auf einer homogenen JAM-B Oberfläche können diese Phänomene deutlich stärker beobachtet werden als auf einer unspezifischen Proteinmatrix (BSA). Es wird also deutlich, dass T-Lymphozyten in der Lage sind, auch unter dynamischen Bedingungen mit JAM-B zu interagieren, was ja für fest an Endothel gebundene Leukozyten bereits gezeigt worden ist.

## 4.5 T-Lymphozyten interagieren unter dynamischen Bedingungen mit JAM-B

Es ist bereits bekannt, dass T-Lymphozyten JAM-B binden können<sup>78,79</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass dies auch unter dynamischen Bedingungen der Fall sein kann.

Auf einer mit JAM-B beschichteten Oberfläche wurde mehr Rolling beobachtet als auf unspezifischem Protein. Werden HUVEC mit einem monoklonalen Antikörper gegen JAM-B behandelt, so rollen weniger T-Lymphozyten auf ihnen. Inwieweit diese Beobachtungen auch in vivo von Bedeutung sind, ist unklar. Zwar wurde bereits gezeigt, dass ein JAM-B Antikörper die Entstehung eines entzündlichen Infiltrates inhibieren kann<sup>49</sup>. Ob hierbei aber vermindertes Rolling von zentraler Bedeutung ist, konnte nicht ermittelt werden. Die Extravasation ist ein komplizierter Prozess, an dem zahlreiche Moleküle beteiligt sind. Dies macht bei Blockade eines einzigen Moleküls Kompensationsmechanismen wahrscheinlich. Es sind bereits zahlreiche Adhäsionsmoleküle bekannt, die das Capturing/Rolling vermitteln.

### 4.5.1 Rolling wird durch zahlreiche Adhäsionsmoleküle vermittelt

Hier sind Selectine, im speziellen E- und P- Selectine von zentraler Bedeutung<sup>11 15</sup>. Die Expression von E- Selectin auf der Endothelzelle wird transkriptionell reguliert<sup>80,81</sup>, während das P- Selectin hauptsächlich in den Weibel- Pallade Körperchen von Endothelzellen gespeichert ist. Es wird von dort aus durch Exozytose relativ schnell an die Membranoberfläche befördert<sup>5,6</sup>. Ein kleiner Teil der P- Selectin Expression ist transkriptionell durch inflammatorische Stimuli reguliert<sup>82</sup>. Die Selectine binden an Glycoprotein oder Glycopeptidrezeptoren der Leukozyten wie PSGL-1 oder CLA<sup>83,84</sup>. Durch Chemokine wird die noch lockere Bindung der Zellen verstärkt, das Rolling stoppt<sup>85</sup>. Die zentrale Bedeutung von E- und P-Selectin für das Leukozytenrolling konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden<sup>86,87</sup>. In einer Studie konnte allerdings ein spezifischer Antikörper gegen E-Selectin die

Entzündungsaktivität einer Psoriasis nicht vermindern<sup>88</sup>. Wurden hingegen beide Selectine mit Efomycin M blockiert, so sorgte dies in einem Mausmodell für ein vermindertes Rolling und eine geringere chronische Entzündung<sup>89</sup>. Zu dem durch Selectine vermitteltem Rolling kommen die Interaktionen der auf T- Lymphozyten vorhandenen  $\beta$ 1- Integrinen. Hiervon ist VLA-4, ein heterodimerer Rezeptor von Bedeutung, der Moleküle aus der Immunglobulinfamilie wie VCAM- 1 und MAdCAM- 1, bindet<sup>11</sup>. VLA-4 befindet sich in den Spitzen der Mikrovilli und kann somit in der frühen Phase des Adhäsionsprozesses aktiv sein<sup>90</sup>. Die überwiegend lockeren Zellbindungen, die durch die Selectine und VLA-4 vermittelt werden, werden im weiteren Prozess ergänzt durch die Aktivierung und feste Adhäsion der Zellen. Hier spielen die  $\beta$ 2 Integrine, z.B. das lymphocyte function- associated antigen- 1 (LFA1), die mit Rezeptoren aus der Immunglobulinfamilie wie intercellular adhesion molecule- 1 (ICAM1) binden, eine wichtige Rolle<sup>91,92</sup>. Aber auch die  $\beta$ 1 Integrine wie etwa das  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4) und seine Bindung an V-CAM sind hier beteiligt<sup>93</sup>.

#### **4.5.2 Die JAMs beeinflussen die Leukozytenwanderung**

Wenn JAM-B am Capturing/ Rolling beteiligt ist, so hat es seine Rolle als eines von vielen Molekülen, die diesen komplexen Schritt vermitteln. Bisher wurde JAM-B eine Rolle bei der Transmigration von Leukozyten zugeschrieben. Dies liegt nah, wenn man die bekannte Lokalisation des JAM-B auf Endothelzellen betrachtet: Bisherige Beobachtungen zeigen es im Bereich der tight junctions, assoziiert mit spezifischen Proteinen<sup>43</sup>. So konnte ein monoklonaler JAM-B Antikörper die Leukozyteneinwanderung in entzündete Haut vermindern<sup>49</sup>. Auch für die anderen beiden klassischen JAM-Moleküle sind Beobachtungen im Bereich der Transmigration gemacht worden. Antikörper gegen JAM-A konnten in vivo die Extravasation von Lymphozyten bei Zytokin- induzierter Meningitis vermindern<sup>94</sup>. Bei bakteriell oder viral induzierter Meningitis versagte der gleiche Antikörper, möglicherweise Zeichen für funktionelle Einschränkungen des JAM-A auf bestimmte Zellpopulationen oder Organbereiche<sup>95</sup>. In vivo verringerte ein JAM-C Antikörper die Neutrophileneinwanderung in einem Peritonitismodell<sup>51</sup>. Die JAMs können also an der Transmigration von Leukozyten beteiligt sein. Es wurden auch noch eine Reihe anderer Moleküle identifiziert, deren funktionelle Bedeutung hierbei gezeigt wurde.

### 4.5.3 Transmigration ist von mehreren Adhäsionsmolekülen abhängig

**Tabelle 18: Adhäsionsmoleküle, deren Blockierung Effekte auf die Transmigration haben**

Molekül	Funktion
PECAM1	Blockade verhindert Leukozytentransmigration in vitro und in vivo <sup>96,97</sup>
MIC2 (CD99)	monoklonaler Antikörper verhindert Monozytendiapedese durch Endothel <sup>98</sup>
VE-Cadherin	Blockade erhöht die Permeabilität von Endothel in vitro und erhöht den Leukozyteneinstrom in vivo <sup>99</sup>
JAM- A, -B, -C	Funktion wurde besprochen

Die Migration durch den Interzellularraum soll hier nicht genauer betrachtet werden. Leukozytenintegrine interagieren mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix.

**Tabelle 19: an der Transmigration beteiligte Faktoren**

Integrin	Bindung an
$\beta 1$ Integrine $\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 5\beta 1$	extrazelluläre Matrix Kollagen Typ I, Fibronectin, Chondroitinsulfat, Laminin, Hyaluronsäure
$\alpha 1\beta 1$ , $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 3\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$	epidermale Basalmembran Kollagen Typ IV, Laminin
$\beta 2$ Integrine $\alpha L\beta 2$	interstitielles ICAM1
CD 44	

### 4.5.4 Die $\beta 1$ Untereinheit des VLA-4 bindet an JAM-B

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die gleichzeitige Blockade von  $\alpha 4\beta 1$  Integrin (VLA-4) und  $\beta 1$  Integrin auf T-Lymphozyten die Anzahl adhärenter Zellen auf einer JAM-B beschichteten Oberfläche vermindert. Dies bestätigt Beobachtungen, die VLA-4 als Bindungspartner von JAM-B identifizierten<sup>46</sup>. Eine Einzelgabe beider Antikörper in halber Konzentration hatte hier keinen Effekt. In diesen Experimenten kam es zu vermindertem Rolling und einer erhöhten Rolling Velocity nach Inkubation der T-Lymphozyten mit Antikörper gegen  $\beta 1$  Integrin oder VLA-4. Offensichtlich kann VLA-4 auf T-Lymphozyten auch während des Rolling an JAM-B binden. Eine Kombination beider Antikörper hatte hier keinen zusätzlichen Effekt. Die Zusammenschau dieser Beobachtungen lässt vermuten, dass die  $\beta 1$  Untereinheit des VLA-4 die entscheidende Bindungsstelle für JAM-B darstellt. Parallel wurden Versuche mit einem monoklonalen JAM-C Antikörper durchgeführt, der aber keinen messbaren Effekt auf Rolling und Adhäsion hatte. Ähnliches zeigen aktuelle Beobachtungen, die keine Relevanz von JAM-C für die Transmigration neutrophiler Granulozyten unter Flussbedingungen sahen<sup>100</sup>.

## 4.6 Integrine sind vielseitige Signalmoleküle

Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die sich aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Einheit zusammensetzen. Aus den bekannten 18  $\alpha$  und 8  $\beta$  Untereinheiten entstehen insgesamt 24 verschiedene Integrine<sup>101</sup>. In unterschiedlicher Form finden sie weite Verbreitung nicht nur auf menschlichen Zellen sondern bereits bei einfachen Tieren wie etwa Schwämmen<sup>102</sup>. Wie die JAM-Proteine stellen sie also eine evolutionär äußerst erfolgreiche Gruppe von Oberflächenmolekülen dar. Die von den Integrinen geregelten Funktionen sind vielfältig und beinhalten Proliferation, Apoptose, Zellform und Polarität, Beweglichkeit, Genexpression und Differenzierung. Man nimmt an, dass Integrine in einem aktiven und inaktiven Zustand vorkommen, der auf Konformationsänderungen der Proteine beruht. Der jeweilige Zustand hängt von der Aktivität der Zelle ab und kann etwa durch Zytokinstimulation geändert werden<sup>101</sup>. Die JAM-Proteine können Integrine binden. JAM-A ist Ligand des Leukozytenintegrins LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2)<sup>45</sup>, JAM-B bindet VLA-4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1)<sup>46</sup> und JAM-C kann unter bestimmten Umständen an  $\alpha$ M $\beta$ 2 Integrin binden<sup>103</sup>.

Über die Struktur der Integrine sind mittlerweile zahlreiche Details bekannt. Etwa die Hälfte der bei Säugetieren vorkommenden  $\alpha$  Untereinheiten besitzt eine so genannte I/A Domäne an deren Spitze ist oftmals ein Metallion komplexiert ist<sup>104</sup>. Aus diesem Grund, und weil diese Domäne die Bindungsstelle der Untereinheit enthält, wird sie als metal ion adhesion site (MIDAS) bezeichnet. Auch zahlreiche  $\beta$  Untereinheiten besitzen ein MIDAS Motiv, über das sie Liganden binden können. Für die zwei Aktivitätszustände der Integrine scheint ebenfalls das MIDAS Motiv mit dem Metallkomplex verantwortlich zu sein<sup>101</sup>. Es ist bisher nicht bekannt, ob bei der Bindung an die JAMs ebenfalls MIDAS verantwortlich ist. Auch wenn die Beobachtungen dieser Arbeit zumindest die Bedeutung des  $\beta$ 1 Integrins hierfür herausgestellt haben, wäre eine genauere Charakterisierung sicher wünschenswert. Auch von Seiten der JAMs sind hinsichtlich der Bindung noch nicht alle Details geklärt. Während lösliches JAM-C bevorzugt als Homodimer zu finden ist, verbleibt JAM-B als Monomer<sup>79,103</sup>. Bei Anwesenheit von JAM-B und JAM-C bilden sich dagegen bevorzugt heterodimere Strukturen. Diese Interaktionen beeinflussen auch die Integrinbindung, da sie JAM-C für  $\alpha$ M $\beta$ 2 Integrin erreichbar machen können<sup>103</sup>. Auf T-Lymphozyten konnte JAM-B bisher nicht nachgewiesen werden, deshalb sind die eben beschriebenen Mechanismen der Integrinbindung nicht wahrscheinlich. Welcher Teil der extrazellulären Domänen des JAM-B die Integrine bindet ist unklar. Für JAM-C konnte gezeigt werden, dass die membran-distale V-Domäne eine Bindung möglich macht, allerdings hier die Bindung zu JAM-B. Für die C2-Domäne wurde eine stabilisierende Funktion postuliert<sup>103</sup>. Für JAM-B sind solche Daten bisher nicht bekannt. Der hohe Verwandtschaftsgrad beider Moleküle macht aber ähnliche Mechanismen wahrscheinlich.

## 4.7 Die JAM Expression ist bei Krankheit verändert

Bei der Transmigration von Leukozyten spielt JAM-B, lokalisiert im Bereich der tight-junctions, eine wichtige Rolle. Um jedoch nicht nur eine theoretische, sondern auch eine funktionell bedeutsame Rolle bei der frühen Extravasation einnehmen zu können, war die Beobachtung wichtig, dass JAM-B nach Applikation eines inflammatorischen Stimulus auch auf der apikalen bzw. lumenseitigen Zellmembran exprimiert wird. Nur dies erlaubt einen Kontakt zwischen JAM-B und möglichen Liganden wie dem  $\alpha 4\beta 1$  Integrin VLA4 während des Capturing/Rolling. Es wurde bereits für einige Adhäsionsmoleküle gezeigt, dass deren Verteilung und Lokalisation von Bedeutung sein kann. So kann etwa  $\alpha 4$  oder  $\beta 7$  Integrin, wenn es auf den Spitzen der Mikrovilli von T-Lymphozyten lokalisiert ist, auch für den initialen Kontakt dieser Zellen mit dem Endothel verantwortlich sein kann<sup>90</sup>. Wird CD44, normalerweise auf den Mikrovilli nicht vorhanden, auf transfizierten Zellen dort exprimiert, so kann dieses Molekül lockere Zellkontakte und Rolling vermitteln<sup>105</sup>. Auch für die JAMs ist bekannt, dass sie, je nach Stimulus, auf unterschiedlichen Teilen der Zellmembran exprimiert sein können. In vitro führte die Stimulation von Endothelzellen mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  zu einer Umverteilung von JAM-A<sup>70</sup>. Normalerweise im Bereich der Interzellularverbindungen vorhanden, kam es zur Expression auf der apikalen Seite der Zellmembran, wo es von rollenden Leukozyten erreicht werden kann. Auch nach Stimulation mit basic fibroblast growth factor findet eine Umverteilung von JAM-A auf die Zelloberfläche statt<sup>106</sup>. In Gefäßwandläsionen, wie etwa bei Artherosklerose, scheint JAM-A ebenfalls vermehrt vorzukommen, ebenso steigt die Menge an in Ratten mit Hypertonie<sup>108</sup>. Für die Expression von JAM-A scheinen also sowohl bekannte Zytokine als auch unbekannte entzündliche oder physikalische Faktoren verantwortlich zu sein. JAM-B kann ebenfalls nach Zytokinstimulation auf die lumenseitige Zellmembran von Endothelzellen umgelagert werden<sup>71</sup>. Vermehrt wird JAM-B auch in Geweben mit chronisch-entzündlichen Veränderungen gefunden wie Asthma bronchiale, interstitielle Nephritis, Autoimmunhepatitis und alkoholtoxischer Leberzirrhose<sup>79</sup>. Dies bedeutet für JAM-B, dass seine Funktion zumindest teilweise von seinem Expressionsmuster abhängt. Die genauen Signalmechanismen, wirksame Stimuli, und die Mechanismen der Translokation von der lateralen auf die apikale Zellmembran sowie deren Relevanz in vivo wurden in dieser Arbeit nicht geklärt.

JAM-C wird, ähnlich wie JAM-A vermehrt auf artherosklerotisch verändertem Endothel gefunden. Eine Umlagerung von den Interzellularverbindungen auf die apikale Zellmembran konnte nach Stimulation mit oxidierten Lipoproteinen beobachtet werden<sup>109</sup>. Das Vorhandensein von JAM-B konnte hingegen eine Rekrutierung von JAM-C weg von der apikalen Seite hin zu den Interzellularverbindungen bewirken<sup>103</sup>. Teilweise sind die Berichte über die Lokalisation der JAMs noch widersprüchlich. Eine Arbeitsgruppe konnte JAM-C auf

MDCK (Madin-Darby canine kidney) Zellen zuerst nur im Bereich der tight junctions nachweisen. Später fand sich JAM-C dann auch auf der apikalen Membran dieser Zellen. Zur Erklärung dieser Diskrepanz zog man die Dauer heran, in denen die Zellen bis zur Analyse kultiviert wurden (2 Tage vs. 11Tage)<sup>103</sup>. Zusammenfassend zeigen die Daten für die JAM-Proteine eine ausgeprägte Variabilität der Expression, wobei unterschiedlichste Faktoren hierauf Einfluss nehmen können.

#### **4.8 Die Familie der JAMs: differenzierte Expression**

Die Proteine der JAM-Familie sind in ihrem Vorkommen auf bestimmte Gewebe beschränkt. Es wurde gezeigt, dass JAM-B beispielsweise an epithelialen Zellen fehlt, während es in den Venolen mit hohem Endothel des Lymphknotens und der Peyerschen Plaques in hoher Dichte vorkommt, beides Orte mit hohem Leukozytenverkehr<sup>110</sup>. JAM-A hingegen besitzt ein weites Expressionsmuster auf unterschiedlichsten Geweben von Epithel und Endothel<sup>18</sup>. Diese Heterogenität von Interzellularverbindungen konnte auch in funktionellen Studien gezeigt werden: Die Behandlung mit einem JAM-A Antikörper blockierte die Monozyteninfiltration in einem Entzündungsmodell mit subkutanen Air-Pouches<sup>111</sup>. Unerwarteter Weise zeigten Mäuse mit einer fehlenden JAM- A Expression eine gesteigerte Entzündungsantwort in einem Modell für Hypersensitivität vom Spättyp. Diese Beobachtung war verknüpft mit einer erhöhten Wanderung JAM-A defizienter dendritischer Zellen in periphere Lymphknoten<sup>112</sup>. Dieser entzündungshemmende Effekt von JAM-A konnte auch in einem Modell von Colitis beobachtet werden. JAM-A defiziente Mäuse zeigten verstärkte leukozytäre Infiltrate und gesteigerte Permeabilität des Epithels im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Ob gleich die Entzündung bei diesen Tieren klinisch eindrucksvoller verlief, fanden sich in der betroffenen Mukosa weniger Schäden und erhöhte Epithelproliferation<sup>23</sup>. Im Gegensatz dazu führte die JAM-B Inhibition zu einer mildereren Immunantwort bei einem Modell von Kontaktallergie<sup>49</sup>. Die Funktion der JAMs ist also möglicherweise abhängig von dem Gewebe, in dem sie vorkommen. Im Hinblick auf eine antiinflammatorische Therapie würden sich für JAM-B einige Vorteile ergeben. Sein recht spezifisches Vorkommen in leukozytenreichen Geweben könnte weniger Nebenwirkungen verursachen als bei JAM-A, das wesentlich verbreiteter ist. Epitheliale Barrieren würden durch die Inhibition ebenfalls nicht beeinträchtigt, was die Komplikationsrate unter Immunsuppression senken könnte.

#### **4.9 Die Familie der JAMs: differenzierte Adhäsion**

Die Mitglieder der JAM Familie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres Expressionsmusters an Zellverbindungen, sondern auch in der Fähigkeit, mit unterschiedlichen Leukozytenpopulationen zu interagieren. Dies ist zum einen durch die unterschiedlichen Liganden der JAMs wie Integrine bedingt. Zum anderen zeigen

Daten aus Experimenten in vivo, dass JAM-A zwar Neutrophile, nicht aber T-Lymphozyten in einem Modell mit Reperfusion nach Ischämie bindet<sup>113</sup>. Für JAM-C wurde in vitro gezeigt, dass die Transmigration von Neutrophilen unter Flussbedingungen unabhängig von JAM-C ist<sup>100</sup>. Im Gegensatz dazu zeigt diese Arbeit, dass JAM-B mit T-Lymphozyten unter dynamischen Bedingungen interagiert. Möglicherweise bergen diese Beobachtungen und das Profil von JAM-B Vorteile für eine Nutzung als therapeutisches Ziel.

Obwohl JAM-B vergleichsweise unselektiv an der Extravasation beteiligt ist, scheint es andererseits relativ organspezifisch in diesem Prozess zu sein: Während die Blockade von JAM-B mittels Antikörper die Entzündungsreaktion in der Haut deutlich senkte, hatte derselbe Antikörper bei der Generierung der Immunantwort nur einen marginalen Effekt<sup>71</sup>. Diese unterschiedliche Beeinflussung von JAM-B in immunologischen Prozessen macht es als potentiellen Angriffspunkt einer antiinflammatorischen Therapie bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen interessant, beispielsweise der Psoriasis. Der Vorteil wäre ein guter hautspezifischer Effekt auf die Entzündung bei gleichzeitig geringer systemischer Immunsuppression.

## **4.10 Ergebnisse in Zusammenschau und Probleme dieser Arbeit**

### **4.10.1 Ist JAM-B Bindung an VLA-4 unabhängig von JAM-C?**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass T-Lymphozyten an JAM-B binden können und damit bereits bekannte Ergebnisse bestätigt<sup>114</sup>. Hierfür zeigt sich vermutlich das T-Zellintegrin VLA-4 verantwortlich, dessen Bindung an JAM-B ebenfalls bereits beschrieben wurde<sup>46</sup>. Allerdings war man bisher davon ausgegangen, dass diese Interaktion nur bei Anwesenheit von JAM-C stattfinden kann. In unseren Versuchen hatte ein monoklonaler Antikörper gegen JAM-C keinen Effekt auf das Rolling von T-Lymphozyten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass die Transmigration neutrophiler Granulozyten unter Flussbedingungen unabhängig von JAM-C abläuft<sup>100</sup>. Die Beobachtung, dass für die VLA-4 Bindung an JAM-B JAM-C vorhanden sein muss, wurde anhand statischer Bindungsassays gemacht und spiegelt somit nicht die Bedingungen in unseren Experimenten wider. Möglicherweise ist die Funktion von JAM-B beim Capturing/Rolling unabhängig von JAM-C.

### **4.10.2 Warum vermindert JAM-B Blockade das Rolling, aber nicht die Adhäsion?**

In allen Experimenten vermochten die monoklonalen Antikörper keine suffiziente Reduktion adhätierender T-Lymphozyten herbeiführen. Dies kann damit erklärt werden, dass bei bereits gebundenen Zellen kompensatorisch andere Moleküle die

festen Adhäsion vermitteln. Zudem ist der Versuchsaufbau explizit für Beobachtungen unter Flussbedingungen ausgelegt. Beobachtungen nach dem Ausschalten der Strömung sind somit nur begrenzt verallgemeinbar. Allerdings reduzierte die Blockade von JAM-B auf HUVEC nicht die Zahl der adhärenen Zellen, während ein JAM-B Antikörper *in vivo* das entzündliche Infiltrat verkleinern kann<sup>49</sup>. Wiederum erlaubt der Versuchsaufbau mit HUVEC keine genauen Aussagen über das Transmigrationsverhalten der T-Lymphozyten, es ist aber natürlich leicht vorstellbar, dass fest gebundene Zellen auch transmigrieren und ein entzündliches Infiltrat verursachen. Für diese Diskrepanz zwischen Ergebnissen *in vivo* und *in vitro* kann hier keine schlüssige Erklärung gegeben werden. In dem in dem Tiermodell wurde erst nach 48 Stunden die Entzündungsantwort evaluiert, *in vitro* nur bis 30 Minuten nach Versuchsbeginn. In dem unbeobachteten Zeitraum, der immerhin fast zwei Tage beträgt, finden möglicherweise Wanderungsbewegungen der Leukozyten in beide Richtungen statt. Transmigration ist kein unidirektionaler Vorgang, ein gewisser Teil der Zellen wandert auch immer wieder vom entzündlichen Infiltrat weg in Richtung des Gefäßlumens. Dieser als Reverse Transmigration bezeichnete Vorgang spielt möglicherweise bei der Entzündungsmodulation von JAM-C eine Rolle<sup>115</sup>.

#### **4.10.3 Verhindert JAM-B die Rückwanderung der Immunzellen in die Blutgefäße (reversed transmigration)?**

Es wurden verschiedene Stimuli angesprochen, die Zellen dazu veranlassen, aus dem Blutgefäßsystem in das Gewebe auszuwandern. Die einzelnen Schritte wurden differenziert besprochen und sollen an dieser Stelle nicht näher erläutert werden. Letztendlich sind aber für die klinisch sichtbare Entzündungsreaktion viel mehr Schritte erforderlich als die eigentliche Extravasation. Ein entzündliches Infiltrat entsteht erst im Verlauf von mehreren Stunden, und nicht alle Zellen, die die Endothelschicht durchdrungen haben beteiligen sich daran. Für einen Teil der initial eingewanderten Zellen ist der Stimulus unter Umständen nicht stark genug, um dauerhaft im Gewebe zu verweilen. Deshalb kommt es nach einiger Zeit zu einer Rückbewegung in Richtung des Gefäßlumens, der sogenannte „Reversed Transmigration“. So ließ sich in einem Modellgewebe aus humanen Endothelzellen und bovinem Kollagen die Rate rückwärts migrierender CD16 positiver Monozyten bei Zusatz eines Antikörpers gegen den Lipidtransporter MDR-1 signifikant senken<sup>116</sup>. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein Antikörper gegen JAM-C für eine höhere Rate an rückwärts- transmigrierenden Zellen sorgte<sup>115</sup>. Bekanntermaßen reduziert die Blockade von JAM-C die Entzündungsantwort *in vivo*, möglicherweise durch eine gesteigerte Zahl von Leukozyten, die wieder aus dem Entzündungsherd auswandern. Eine ähnliche Vermutung legen unsere Ergebnisse mit JAM-B nahe: Während ein JAM-B Antikörper das Entzündungsinfiltrat *in vivo* signifikant reduzieren konnte<sup>49</sup>, vermochte er die Anzahl der adhärenen Leukozyten

auf HUVEC in vitro nicht zu verringern. Die erhöhte Reverse Transmigration kam besonders in einem Zeitraum zwischen 30 und 45 Minuten nach Versuchsbeginn zum tragen, in dieser Zeit wurden weder die in vitro noch die in vivo Experimente mit JAM-B ausgewertet. Ob also noch ein anderer Mechanismus diese Diskrepanz zwischen in vitro und in vivo Beobachtung erklären kann, muss noch geklärt werden.

#### **4.11 JAM-B ist ein vielseitiges Adhäsionsmolekül**

Die JAM Moleküle gehören zur Immunglobulin- Superfamilie, speziell der Untergruppe CD2 und bestehen aus zwei extrazellulären den Immunglobulinen ähnlichen Domänen, einer einzelnen transmembranären Domäne und einem kurzen intrazellulären Endteil. Moleküle dieser Art finden sich bereits bei niederen Tieren wie etwa bestimmten Schwämmen. Die eigentlichen JAMs werden bereits von Fliegen und Moskitos zur Infektabwehr verwandt<sup>117</sup>. Es handelt sich also um evolutionär äußerst erfolgreiche Strukturen, die, wie bereits ausgeführt, unterschiedlichsten Aufgaben dienen. Dies ist beispielsweise das äußerst komplizierte und subtile Zusammenspiel bei der Extravasation in Säugetieren. Aber auch radikalere Mechanismen der Infektabwehr sind bekannt. So können die V- Domänen der JAMs gut von Viren gebunden werden, ein Beispiel dafür ist JAM-A bei der Reovirusbindung<sup>118</sup>. Virusbindung an VE-JAM löst die Apoptose der betroffenen Zelle aus, eine wirkungsvolle wenn auch radikale Form der Abwehr. Diese kann bei einfachen Tieren, etwa bei Korallen beobachtet werden<sup>119</sup>. Die JAMs sind aber nicht nur auf Zellen der Immunabwehr vorhanden. Neuere Arbeiten berichten von Vorkommen in der Retina und in Spermien. In der Retina wird JAM-C mit der Retinogenese in Verbindung gebracht<sup>120</sup>. In Spermien von Mäusen ist JAM-A für die Motilität unerlässlich<sup>121</sup>. Sie scheinen somit nicht nur in vielen Spezies an unterschiedlichsten Stellen vorzukommen, sondern auch in ihrer Funktionalität wahre Multitalente zu sein. Möglicherweise übernehmen sie verschiedenste Funktionen bei Immunabwehr und Regelung von Zellverkehr, und zwar so lange, bis spezifische Moleküle für diese Aufgaben zur Verfügung stehen.

So lässt sich vielleicht auch die Multifunktionalität des JAM-B auffassen. Die Lokalisation von JAM- B auf der lumenseitigen Zellmembran von Endothelzellen erlaubt durch Interaktion mit  $\alpha 4\beta 1$  Integrin sowohl rolling als auch sticking in vitro. Diese Beobachtung unterscheidet die (patho)- physiologische Rolle von JAM- B von der der meisten anderen bekannten Adhäsionsmoleküle: Mit der Ausnahme von VLA4/ VCAM1 die sowohl beim langsamen rolling als auch bei der festen Adhäsion von Leukozyten in der Haut beteiligt sind<sup>15</sup>, JAM A/LFA 1, beteiligt bei Adhäsion und Transmigration<sup>45</sup> und MAC1/ JAM C auch hier bei Adhäsion und Transmigration beteiligt<sup>47,122</sup>, vermitteln alle Adhäsionsmoleküle in der Kaskade der Extravasation nur einen einzigen spezifischen Schritt. Dies erlaubt eine genaue Gewebs- und zellpopulationsspezifische Steuerung dieses Prozesses. Im Gegensatz zu diesen Spezialisten unter den Molekülen scheint JAM-B eine Grenzfunktion auszuüben, da es an den meisten Schritten der Extravasation beteiligt ist.

## 5 Zusammenfassung

Die Entzündung ist eine grundlegende und lebensnotwendige Reaktion unseres Immunsystems. Leukozyten wandern aus der Blutbahn an die Orte des entzündlichen Geschehens. Für diesen Prozess der Extravasation sind Adhäsionsmoleküle notwendig, die den gesamten Vorgang vom ersten Kontakt mit dem Endothel bis zur Transmigration durch die Basalmembran vermitteln. Eines dieser Moleküle ist das Junctional adhesion molecule-B (JAM-B), ein Immunglobulin-ähnliches Adhäsionsmolekül. JAM-B ist an der Transmigration von Leukozyten beteiligt, es bindet an T-Lymphozyten und speziell das Integrin VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) unter Beteiligung des verwandten JAM-C.

JAM-B befindet sich bevorzugt im Bereich der lateralen Zellmembran von Endothelzellen, kann aber nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  auch auf der apikalen Membranseite gefunden werden. Diese Arbeit behandelt die Fragestellung, ob JAM-B auch in der frühen Phase der Extravasation mit T-Lymphozyten in Kontakt treten kann.

Zuerst wurde untersucht, ob JAM-B unter dynamischen Bedingungen mit T-Lymphozyten in Kontakt treten kann. Die T-Lymphozyten wurden aus Leukozytenkonzentraten extrahiert. Sie wurden über eine mit JAM-B Protein beschichtete Glasoberfläche perfundiert und die Anzahl der rollenden Zellen, deren Geschwindigkeit und die Zahl der adhärenen Zellen bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein mit unspezifischem Protein (BSA) beschichtete Oberfläche.

Um die Rolle des möglichen Bindungspartners VLA-4 zu charakterisieren, wurden die T-Lymphozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen VLA-4 oder der  $\beta 1$  Untereinheit dieses Integrins oder JAM-C inkubiert. Von allen Antikörpern wurden zudem entsprechende Isotypkontrollen durchgeführt.

In diesen Versuchen konnten bereits publizierte Beobachtungen reproduziert werden: So adhärten die T-Lymphozyten bevorzugt auf JAM-B im Vergleich zur Kontrolle mit unspezifischem BSA. Antikörper gegen VLA-4 und  $\beta 1$  Integrin vermochten die Zahl adhärenen Zellen signifikant zu senken. Es zeigte sich außerdem, dass auf JAM-B vermehrt Zellen rollten und deren Geschwindigkeit im Durchschnitt niedriger war. Damit fanden sich erstmals Hinweise darauf, dass JAM-B auch unter dynamischen Bedingungen an T-Lymphozyten bindet. Antikörper gegen VLA-4 oder  $\beta 1$  Integrin führten das Rolling auf das Niveau der Kontrolle zurück. Ein JAM-C Antikörper hatte keinen Effekt, sodass JAM-B vermitteltes Rolling und Adhäsion möglicherweise unabhängig von JAM-C sind.

In weiteren Experimenten wurde die Relevanz dieser Interaktionen in einer Flusskammer mit Endothelzellbeschichtung untersucht. Auf einem speziellen Objektträger mit Flusskanal wurden humane Endothelzellen (HUVEC) angezüchtet und vor Versuchsbeginn mit  $\text{TNF}\alpha$  inkubiert. Anschließend wurde ein monoklonaler Antikörper gegen JAM-B aufgebracht und T-Lymphozyten durch die Flusskammer

perfundiert. Die Auswertung erfolgte anhand der Parameter aus dem ersten Flusskammerexperiment.

Der JAM-B Antikörper verminderte das Rolling signifikant im Vergleich zur Leerkontrolle und führte zur Erhöhung der Rollgeschwindigkeit dieser Zellen. Die Zahl adhärenter Zellen vermochte er nicht zu senken. Wenn JAM-B durch Stimulation auf der Oberfläche von Endothel exprimiert wird, kann es also an der Extravasation von T-Lymphozyten beteiligt sein. Die Daten zeigen, dass JAM-B mit T-Lymphozyten unter dynamischen Bedingungen interagieren kann und deuten darauf hin, dass es an der Extravasation beteiligt ist.

Die Antikörper konnten bei Einzelgabe die Zahl adhärenter Zellen nicht senken. Möglicherweise ist dies Folge der kompensatorischen Wirkung anderer Adhäsionsmoleküle. In vivo Experimente unterstützen die These von der Beteiligung des JAM-B an der Entzündungsreaktion. Ein monoklonaler Antikörper konnte das entzündliche Infiltrat in einem Mausmodell von Kontakthypersensitivität vom Spättyp reduzieren. Da in der vorliegenden Arbeit der Antikörper die Zahl adhärenter Zellen nicht verringern konnte, kommen möglicherweise andere Mechanismen in Betracht. Für JAM-C wurden ähnliche Daten erhoben, hier lag die Ursache der mildereren Entzündungsantwort nicht in einer verringerten Zahl eingewanderter Zellen. Die Blockade führte vielmehr zur vermehrten Rückwanderung der Zellen aus dem Entzündungsgebiet. Möglicherweise liegt bei JAM-B ein ähnlicher Mechanismus vor. JAM-B erfüllt als phylogenetisch altes Molekül verschiedene Aufgaben bei der Extravasation. Sein Expressionsmuster auf Endothel, besonders der lymphatischen Gefäße, macht es als Ziel für innovative anti-inflammatorische Therapieansätze interessant.

## **Abstract**

Inflammation is a basic and vitally essential reaction of our immune system. Leukocytes move out of the bloodstream to the location of the inflammatory event. Adhesion molecules are required for the process of extravasation and assist the entire process, from initial contact with the endothelium, through the transmigration across the basal membrane. One of these molecules is the junctional adhesion molecule-B (JAM-B), an immunoglobulin-like adhesion molecule. JAM-B is involved in the transmigration of leukocytes, it binds with T-lymphocytes and particularly with the integrin VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) in cooperation with the related JAM-C molecule.

JAM-B is generally found near the lateral cell membrane of endothelial cells, but can be found on the apical membrane side after stimulation with TNF $\alpha$ . This paper deals with the issue of whether JAM-B can come into contact with T-lymphocytes in earlier phases of extravasation.

Initial experiments tested whether JAM-B came into contact with T-lymphocytes in dynamic conditions. The T-lymphocytes were extracted from leukocyte concentrations.

They were perfused over a glass surface covered with JAM-B proteins and the amount of rolling cells, their speed and the number of adherent cells was predetermined. A surface covered with an unspecific protein (BSA) served as negative control. To characterize the role of VLA-4, the potential binding partner, T-lymphocytes were incubated against VLA-4, the  $\beta 1$  subunit of the integrin or JAM-C with monoclonal antibodies. Corresponding isotype tests were carried out on all antibodies.

In these tests, previously publicized observations were reproduced: where T-lymphocytes preferentially adhered to JAM-B as compared to the control with the unspecific BSA. VLA-4 and  $\beta 1$  integrin antibodies were capable of significantly reducing the number of adherent cells. It was also demonstrated that JAM-B propagated cells rolled and that on average their speed was lower. This initially suggests that JAM-B binds with T-lymphocytes in dynamic conditions. VLA-4 and  $\beta 1$  integrin antibodies return the rolling back to the level of the control. The JAM-C antibody had no effect, such that rolling and adhesion facilitated by JAM-B may be independent from JAM-C.

Further experiments examined the relevance of these interactions in a flow chamber with an endothelial cell coating. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were grown on a special slide with a flow channel and incubated with TNF $\alpha$  prior to experimentation. Afterwards, T-lymphocytes were incubated with a monoclonal antibody against JAM-B and perfused through the flow chamber. The analysis took place based upon the parameters from the first flow chamber experiment.

The JAM-B antibody reduced the rolling significantly in comparison to the control and led to an increased roll speed for these cells. The number of adherent cells was not reduced. If JAM-B can be expressed through stimulation on the surface of endothel, then it can play a role in the extravasation of T-lymphocytes.

Individually, the antibody was not able to reduce the amount of adherent cells. This could be due to the compensatory effect of other adhesion molecules. In vivo experiments support the assumption of the participation of JAM-B on the inflammation reaction. A monoclonal antibody was able to reduce the inflammatory infiltrate in a mouse model of late phase contact hypersensitivity. Since the amount of adherent cells could not be reduced by the antibody in these experiments, it is possible that other mechanisms must be taken into consideration. Similar data was observed for JAM-C. In this case, the cause of the mild inflammation response was not due to a reduced amount of migrated cells. Rather, the blockage leads to an increased return of the cells to the inflamed area. Potentially, a similar mechanism occurs with JAM-B.

As a phylogenetically old molecule, JAM-B performs various tasks in extravasation. Its expression pattern on endothelial cells, especially on the lymphatic tissues, makes it an interesting subject for innovative anti-inflammatory therapy.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol.* 1977;86(1):183-276
- 2 Groves RW, Kupper TS. Leukocyte recruitment in cutaneous inflammation. In: *Leukocyte recruitment in inflammatory disease.* Peltz G (Ed), Springer, New York, (1996): 71-84
- 3 Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med.* 1999;341(24):1817-28.
- 4 Firrell JC, Lipowsky HH. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *Am J Physiol.* 1989;256(6 Pt 2):H1667-74.
- 5 McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84(1):92-9.
- 6 Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 1989;73(5):1109-12.
- 7 Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):381-4. In: *Immunobiology fourth edition* Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, Elsevier Science, London (1999) 377-378
- 8 Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:155-77. In: *Immunobiology fourth edition* Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, Elsevier Science, London (1999) 377-378
- 9 Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(3):336-41.
- 10 Dustin ML, Carpen O, Springer TA. Regulation of locomotion and cell-cell contact area by the LFA-1 and ICAM-1 adhesion receptors. *J Immunol.* 1992;148(9):2654-63.]
- 11 Schön MP, Ludwig RJ. Lymphocyte trafficking to inflamed skin--molecular mechanisms and implications for therapeutic target molecules. *Expert Opin Ther Targets.* 2005;9(2):225-43.
- 12 *Immunobiology fourth edition* Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, Elsevier Science, London (1999) 377-378
- 13 Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med.* 2003;9(6):263-8.
- 14 Feizi T. Carbohydrate ligands for the leukocyte-endothelium adhesion molecules, selectins. *Results Probl Cell Differ.* 2001;33:201-23.
- 15 Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996;272(5258):60-6.
- 16 Bradfield PF, Nourshargh S, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(10):2104-12.
- 17 Madri JA, Graesser D. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Dev Immunol.* 2000;7(2-4):103-16.
- 18 Mandell KJ, Parkos CA. The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 200;57(6):857-67.

- 19 Daniele LL, Adams RH, Durante DE, Pugh EN Jr, Philp NJ. Novel distribution of junctional adhesion molecule-C in the neural retina and retinal pigment epithelium. *J Comp Neurol*. 2007;505(2):166-76.
- 20 Ueki T, Iwasawa K, Ishikawa H, Sawa Y. Expression of junctional adhesion molecules on the human lymphatic endothelium. *Microvasc Res*. 2008;75(2):269-78.
- 21 Sugano Y, Takeuchi M, Hirata A, Matsushita H, Kitamura T, Tanaka M, Miyajima A. Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 2008;111(3):1167-72.
- 22 Shao M, Ghosh A, Cooke VG, Naik UP, Martin-DeLeon PA. JAM-A is present in mammalian spermatozoa where it is essential for normal motility. *Dev Biol*. 2008;313(1):246-55.
- 23 Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A, Parkos CA. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*. 2007;204(13):3067-76.
- 24 Mandicourt G, Iden S, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM-C regulates tight junctions and integrin-mediated cell adhesion and migration. *J Biol Chem*. 2007;282(3):1830-7.
- 25 Vonlaufen A, Aurrand-Lions M, Pastor CM, Lamagna C, Hadengue A, Imhof BA, Frossard JL. The role of junctional adhesion molecule C (JAM-C) in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2006;209(4):540-8.
- 26 Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 19):3879-91.
- 27 Chavakis T, Orlova V. The role of junctional adhesion molecules in interactions between vascular cells. *Methods Mol Biol*. 2006;341:37-50.
- 28 Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol*. 2004;(12):640-4.
- 29 Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*. 1996;5(12):2375-90.
- 30 Rizo J, Südhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem*. 1998;273(26):15879-82.
- 31 Koonin EV, Woods DF, Bryant PJ. dlG-R proteins: modified guanylate kinases. *Nat Genet*. 1992;2(4):256-7.
- 32 Ponting CP, Phillips C. DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. *Trends Biochem Sci*. 1995 Mar;20(3):102-3.
- 33 Noury C, Grant SG, Borg JP. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE*. 2003;2003(179).
- 34 Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):467-77.
- 35 Du Pasquier L. Speculations on the origin of the vertebrate immune system. *Immunol Lett*. 2004;92(1-2):3-9.]
- 36 Prota AE, Campbell JA, Schelling P, Forrest JC, Watson MJ, Peters TR, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Dermody TS, Stehle T. Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5366-71.
- 37 Kostrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni G, Dejana E, Bartfai T, Winkler FK, Hennig M. X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO J*. 2001;20(16):4391-8.

- 38 Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998;142(1):117-27.
- 39 Bazzoni G. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost.* 2006;95(1):36-42.
- 40 Mandell KJ, Babbin BA, Nusrat A, Parkos CA. Junctional adhesion molecule 1 regulates epithelial cell morphology through effects on beta1 integrins and Rap1 activity. *J Biol Chem.* 2005;280(12):11665-74.
- 41 Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 2000;113 ( Pt 13):2363-74.
- 42 Mandell KJ, McCall IC, Parkos CA. Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16254-62.
- 43 Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, Imhof BA. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood.* 2001;98(13):3699-707.
- 44 Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, Santoso S, Chavakis T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *J Exp Med.* 2006;203(12):2703-14.
- 45 Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schröder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol.* 2002;3(2):151-8.
- 46 Cunningham SA, Rodriguez JM, Arrate MP, Tran TM, Brock TA. JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27589-92.
- 47 Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med.* 2002;196(5):679-91.
- 48 Babinska A, Kedees MH, Athar H, Ahmed T, Batuman O, Ehrlich YH, Hussain MM, Kornecki E. F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis. *Thromb Haemost.* 2002;88(5):843-50.
- 49 Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, Johann PS, Pfeffer J, Radeke HH, Schön MP, Kaufmann R, Boehncke WH, Podda M. Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 2005;125(5):969-76.
- 50 Johnson-Léger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood.* 2002;100(7):2479-86.
- 51 Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, Hersemeyer K, Sachs UJ, Nawroth PP, Preissner KT, Santoso S. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279(53):55602-8.
- 52 Gowans JL. The lymphocyte--a disgraceful gap in medical knowledge. *Immunol Today.* 1996;17(6):288-91.
- 53 Hamann A, Jablonski-Westrich D, Duijvestijn A, Butcher EC, Baisch H, Harder R, Thiele HG. Evidence for an accessory role of LFA-1 in lymphocyte-high endothelium interaction during homing. *J Immunol.* 1988;140(3):693-9.

- 54 Gunzer M, Schäfer A, Borgmann S, Grabbe S, Zänker KS, Bröcker EB, Kämpgen E, Friedl P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*. 2000;13(3):323-32.
- 55 Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221-7.
- 56 Teraki Y, Picker LJ. Independent regulation of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression and cytokine synthesis phenotype during human CD4<sup>+</sup> memory T cell differentiation. *J Immunol*. 1997;159(12):6018-29.
- 57 Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ, Butcher EC. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1991;174(6):1461-6.
- 58 Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature*. 1991;349(6312):796-9.
- 59 Cinamon G, Shinder V, Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2(6):515-22.
- 60 Gautam N, Herwald H, Hedqvist P, Lindbom L. Signaling via beta(2) integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. *J Exp Med*. 2000;191(11):1829-39.
- 61 Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med*. 1998;188(8):1433-43.
- 62 Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P, Arfors KE, Flodgaard H, Lindbom L. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med*. 2001;7(10):1123-7.
- 63 Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14801-11.
- 64 Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, Vernet T, Gulino-Debrac D. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem*. 2003;278(16):14002-12.
- 65 Allport JR, Muller WA, Luscinskas FW. Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J Cell Biol*. 2000;148(1):203-16.
- 66 Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J Exp Med*. 1997;186(4):517-27.
- 67 Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Luscinskas FW. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol*. 2001;167(4):2323-30.
- 68 Su WH, Chen HI, Jen CJ. Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium. *Blood*. 2002;100(10):3597-603.
- 69 Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*. 2000;275(27):20520-6.
- 70 Ozaki H, Ishii K, Horiuchi H, Arai H, Kawamoto T, Okawa K, Iwamatsu A, Kita T. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immunol*. 1999;163(2):553-7.

- 71 Ludwig RJ, Hardt K, Hatting M, Bistran R, Diehl S, Radeke HH, Podda M, Schön MP, Kaufmann R, Henschler R, Pfeilschifter JM, Santoso S, Boehncke WH. Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with alpha4beta1 integrin. *Immunology*. 2009;128(2):196-205.
- 72 Zen K, Babbin BA, Liu Y, Whelan JB, Nusrat A, Parkos CA. JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Mol Biol Cell*. 2004;15(8):3926-37.
- 73 Luscinckas FW, Lim YC, Lichtman AH. Wall shear stress: the missing step for T cell transmigration? *Nat Immunol*. 2001;2(6):478-80.]
- 74 Goldsmith HL, Spain S. Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvasc Res*. 1984 Mar;27(2):204-22.
- 75 García-Cardena G, Comander JI, Blackman BR, Anderson KR, Gimbrone MA. Mechanosensitive endothelial gene expression profiles: scripts for the role of hemodynamics in atherogenesis? *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:1-6
- 76 Moazzam F, DeLano FA, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. The leukocyte response to fluid stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):5338-43.]
- 77 Cinamon G, Shinder V, Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2(6):515-22
- 78 Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA. Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(49):45826-32.
- 79 Liang TW, Chiu HH, Gurney A, Sidle A, Tumas DB, Schow P, Foster J, Klassen T, Dennis K, DeMarco RA, Pham T, Frantz G, Fong S. Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM 2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3. *J Immunol*. 2002;168(4):1618-26.
- 80 Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 1989;243(4895):1160-5
- 81 Cotran RS, Gimbrone MA Jr, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Pober JS. Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med*. 1986;164(2):661-6
- 82 Ulbrich H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(12):640-7.
- 83 Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(16):7390-7.
- 84 Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature*. 1997;389(6654):978-81.
- 85 Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol*. 2002;14(2):93-104.
- 86 Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84(7):2068-101.
- 87 Rubant SA, Ludwig RJ, Diehl S, Hardt K, Kaufmann R, Pfeilschifter JM, Boehncke WH. Dimethylfumarate reduces leukocyte rolling in vivo through modulation of adhesion molecule expression. *J Invest Dermatol*. 2008 Feb;128(2):326-31. Epub 2007 Aug 2.
- 88 Bhushan M, Bleiker TO, Ballsdon AE, Allen MH, Sopwith M, Robinson MK, Clarke C, Weller RP, Graham-Brown RA, Keefe M, Barker JN, Griffiths CE. Anti-E-selectin is ineffective in the treatment of psoriasis: a randomized trial. *Br J Dermatol*. 2002;146(5):824-31.

- 89 Schön MP, Krahn T, Schön M, Rodriguez ML, Antonicek H, Schultz JE, Ludwig RJ, Zollner TM, Bischoff E, Bremm KD, Schramm M, Henninger K, Kaufmann R, Gollnick HP, Parker CM, Boehncke WH. Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Nat Med.* 2002;8(4):366-72. Erratum in: *Nat Med* 2002;8(6):639.
- 90 Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC.  $\alpha$ 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 1995;80(3):413-22
- 91 Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986;137(1):245-54.
- 92 Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol.* 1989;20(4):617-29.
- 93 Groves RW, Ross EL, Barker JN, MacDonald DM. Vascular cell adhesion molecule-1: expression in normal and diseased skin and regulation in vivo by interferon gamma. *J Am Acad Dermatol.* 1999;29(1):67-72
- 94 Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med.* 1999;190(9):1351-6.
- 95 Lechner F, Sahrbacher U, Suter T, Frei K, Brockhaus M, Koedel U, Fontana A. Antibodies to the junctional adhesion molecule cause disruption of endothelial cells and do not prevent leukocyte influx into the meninges after viral or bacterial infection. *J Infect Dis.* 2000;182(3):978-82.
- 96 Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med.* 1995;182(5):1337-43.
- 97 Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med.* 1994;179(3):1059-64.
- 98 Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol.* 2002;3(2):143-50.
- 99 Gotsch U, Borges E, Bosse R, Böggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* 1997;110 ( Pt 5):583-8.
- 100 Sircar M, Bradfield PF, Aurrand-Lions M, Fish RJ, Alcaide P, Yang L, Newton G, Lamont D, Sehrawat S, Mayadas T, Liang TW, Parkos CA, Imhof BA, Luscinskas FW. Neutrophil transmigration under shear flow conditions in vitro is junctional adhesion molecule-C independent. *J Immunol.* 2007;178(9):5879-87.
- 101 Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110(6):673-87.
- 102 Burke RD. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol.* 1999;191:257-84.
- 103 Lamagna C, Meda P, Mandicourt G, Brown J, Gilbert RJ, Jones EY, Kiefer F, Ruga P, Imhof BA, Aurrand-Lions M. Dual interaction of JAM-C with JAM-B and  $\alpha$ (M) $\beta$ 2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol Biol Cell.* 2005;16(10):4992-5003.
- 104 Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure.* 1995;3(12):1333-40.
- 105 von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell.* 1995;82(6):989-99.

- 106 Naik MU, Mousa SA, Parkos CA, Naik UP. Signaling through JAM-1 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 is required for the angiogenic action of bFGF: dissociation of the JAM-1 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 complex. *Blood*. 2003;102(6):2108-14.
- 107 Ostermann G, Fraemohs L, Baltus T, Schober A, Lietz M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C. Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):729-35.
- 108 Waki H, Liu B, Miyake M, Katahira K, Murphy D, Kasparov S, Paton JF. Junctional adhesion molecule-1 is upregulated in spontaneously hypertensive rats: evidence for a prohypertensive role within the brain stem. *Hypertension*. 2007;49(6):1321-7.
- 109 Keiper T, Al-Fakhri N, Chavakis E, Athanasopoulos AN, Isermann B, Herzog S, Saffrich R, Hersemeyer K, Bohle RM, Haendeler J, Preissner KT, Santoso S, Chavakis T. The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment. *FASEB J*. 2005;19(14):2078-80.
- 110 Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2733-41.
- 111 Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*. 1998;142(1):117-27.
- 112 Cera MR, Del Prete A, Vecchi A, Corada M, Martin-Padura I, Motoike T, Tonetti P, Bazzoni G, Vermi W, Gentili F, Bernasconi S, Sato TN, Mantovani A, Dejana E. Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;114(5):729-38.
- 113 Khandoga A, Kessler JS, Meissner H, Hanschen M, Corada M, Motoike T, Enders G, Dejana E, Krombach F. Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. *Blood*. 2005;106(2):725-33.
- 114 Cunningham SA, Arrate MP, Rodriguez JM, Bjerkce RJ, Vanderslice P, Morris AP, Brock TA. A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule. Characterization of leukocyte interactions. *J Biol Chem*. 2000 ;275(44):34750-6.]
- 115 Bradfield PF, Scheiermann C, Nourshargh S, Ody C, Luscinskas FW, Rainger GE, Nash GB, Miljkovic-Licina M, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation. *Blood*. 2007;110(7):2545-55.
- 116 Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16(+) (Fc $\gamma$ RIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med*. 2002;196(4):517-27. Erratum in: *J Exp Med* 2002;196(6):869.
- 117 Du Pasquier L, Zucchetti I, De Santis R. Immunoglobulin superfamily receptors in protochordates: before RAG time. *Immunol Rev*. 2004;198:233-48.
- 118 Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, Chappell JD, Liu Y, Schnell FJ, Nusrat A, Parkos CA, Dermody TS. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*. 2001;104(3):441-51
- 119 Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol*. 2004;25(12):640-4.
- 120 Daniele LL, Adams RH, Durante DE, Pugh EN Jr, Philp NJ. Novel distribution of junctional adhesion molecule-C in the neural retina and retinal pigment epithelium. *J Comp Neurol*. 2007;505(2):166-76.

121 Shao M, Ghosh A, Cooke VG, Naik UP, Martin-DeLeon PA. JAM-A is present in mammalian spermatozoa where it is essential for normal motility. *Dev Biol.* 2008;313(1):246-55.

122 Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, Wang S, Herrera P, Nourshargh S, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation. *J Immunol.* 2005;174(10):6406-15.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungen

Abbildung 1: die Phasen der Extravasation .....	10
Abbildung 2: schematischer Aufbau eines JAM Proteins nach <sup>35</sup> .....	16
Abbildung 3: schematische Darstellung homo- und heterophiler JAM Interaktionen nach <sup>34</sup> .....	17
Abbildung 4: Vorkommen von JAM Proteinen auf Endothelzellen .....	20
Abbildung 5: Glyco Tech Flusskammersystem aus <a href="http://www.glycotech.com">www.glycotech.com</a> .....	28
Abbildung 6: Flusskammersystem IBIDI aus <a href="http://www.biophysics.com">www.biophysics.com</a> .....	32
Abbildung 7: Flusskammer mit Proteinbeschichtung: geringe und hohe Zellzahl nach 10 Minuten .....	34
Abbildung 8: Flusskammer mit HUVEC: hohe und geringe Zellzahl nach 10 Minuten .....	35
Abbildung 9: fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von JAM-B vs. Kontrolle .....	35
Abbildung 10: Ergebnis Zellrolling JAM-B vs. Kontrolle .....	36
Abbildung 11: Ergebnis Zelladhäsion JAM-B vs. Kontrolle .....	36
Abbildung 12: Ergebnis Zellrolling nach Antikörperblockade von $\beta 1$ oder VLA-4 .....	37
Abbildung 13: Ergebnis Zellrolling nach Antikörperblockade von $\beta 1$ oder VLA-4 .....	38
Abbildung 14: Ergebnis Rollgeschwindigkeit bei Blockade von $\beta 1$ Integrin .....	39
Abbildung 15: Ergebnis Zelladhäsion bei Blockade von VLA-4 und $\beta 1$ .....	40
Abbildung 16: Ergebnis Zellrolling bei JAM-C Blockade .....	41
Abbildung 17: Ergebnis Zellrolling bei JAM-B Blockade auf HUVEC .....	42
Abbildung 18: Ergebnis Rollgeschwindigkeit bei JAM-B Blockade auf HUVEC .....	43
Abbildung 19: Ergebnis Zelladhäsion bei JAM-B Blockade auf HUVEC .....	44
Abbildung 20: Ergebnis Vergleich zweier Untersucher bei gleichem Versuch .....	45

### 7.2 Tabellen

Tabelle 1: Selectine, Übersicht .....	12
nach <sup>12</sup>	
Tabelle 2: Adressine, Übersicht .....	12
nach <sup>12</sup>	
Tabelle 3: Integrine, Übersicht .....	13
nach <sup>12</sup>	
Tabelle 4: Immunglobulinfamilie, Übersicht .....	14
nach <sup>12</sup>	
Tabelle 5: JAM-verwandte Proteine .....	14
nach <sup>17</sup>	
Tabelle 6: JAM-Proteine, Übersicht .....	15
aus <sup>18,19,20,21,22,23,24,25,26,27</sup>	

Tabelle 7: Arbeitsanleitung Leukozytenextraktion .....	24
Tabelle 8: Arbeitsanleitung Extraktion von T-Lymphozyten .....	25
Tabelle 9: Arbeitsanleitung HUVEC Kultivierung .....	26
Tabelle 10: Arbeitsanleitung: HUVEC Pflege.....	26
Tabelle 11: Arbeitsanleitung HUVEC Separation .....	27
Tabelle 12: Arbeitsanleitung HUVEC Nährmediumwechsel .....	27
Tabelle 13: Arbeitsanleitung Aufbereitung T-Lymphozyten .....	29
Tabelle 14: Arbeitsanleitung Vorbereitung der Glasträger.....	30
Tabelle 15: Arbeitsanleitung Aufbringen der Proteinbeschichtung .....	31
Tabelle 16: Arbeitsanleitung Immunfluoreszenz.....	31
Tabelle 17: Protokoll Filmaufzeichnung.....	32
Tabelle 18: Adhäsionsmoleküle, deren Blockierung Effekte auf die Transmigration haben .....	50
aus <sup>96,97,98,99</sup>	
Tabelle 19: an der Transmigration beteiligte Faktoren .....	50
aus <sup>11</sup>	

### 7.3 Lebenslauf

Maximilian Hatting

Geboren am 26.04.1981 in Münster/ Westf.

Ausbildung

1987- 1991 St. Johannes Grundschule in Dorsten

1991- 2000 St. Ursula Gymnasium in Dorsten

08/2000- 06/2001 Zivildienst im Knappschafts Krankenhaus Recklinghausen

10/2001- 03/2008 Studium der Humanmedizin an der Johan Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt/ Main

Physikum am 06.09.2003

Praktisches Jahr im Marienkrankenhaus Frankfurt

Anaesthesie, Innere Medizin, Chirurgie

Staatsexamen am 15.11.2007

Promotion

Seit 10/2005 im immunologischen Labor bei Professor W.H. Boehncke in der Universitäts- Hautklinik in Frankfurt

Seit 01.04.2008 Assistenzarzt am Universitätsklinikum Aachen, Medizinische Klinik III

## 7.4 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle von junctional adhesion molecule- B bei der Extravasation von T-Lymphozyten“

in der Klinik für Dermatologie und Venerologie

unter Betreuung und Anleitung von Professor Dr. med. W.-H.Boehncke

mit Unterstützung durch PD Dr. med. R.J. Ludwig

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, 2009