

Aus der medizinischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz  
Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie  
Leiterin: Professor Dr. C. Müller

**Identifizierung und Charakterisierung  
neuer Aktivierungsmarker auf  
basophilen Granulozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Immanuel Florian Hennersdorf  
aus  
Stuttgart

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Biedermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Müller

**Wir suchen überall das Unbedingte, und finden immer nur Dinge.**

**Novalis**

Für Johanna, Thomas und Natalie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Allergische Erkrankungen und die Bedeutung basophiler Granulozyten.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Eigenschaften basophiler Granulozyten .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Entdeckung und Entstehung.....	5
1.2.2 Phänotyp.....	6
<b>1.3 Aktivierung basophiler Granulozyten .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Signaltransduktion über den hochaffinen IgE- Rezeptor.....	8
1.3.2 Degranulation .....	12
<b>1.4 Aktivierungsmarker basophiler Granulozyten .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 CD63 .....	14
1.4.2 CD107a/ LAMP-1 und CD107b/LAMP-2.....	16
1.4.3 CD203c.....	19
1.4.4 CD164/ MGC- 24 .....	21
1.4.5 CD13/ Aminopeptidase N .....	24
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>25</b>
<b>2 Methoden.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Puffer und Lösungen.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Markierung basophiler Granulozyten aus Vollblut .....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Aktivierung basophiler Granulozyten .....	29
2.2.2 Kombinierte indirekte und direkte Markierung.....	29

## Inhaltsverzeichnis II

2.2.3	Erythrozytenlyse .....	30
2.2.4	Besonderheiten der Markierung in 96-Napf Mikrotiterplatten.....	30
2.2.5	Doppelmarkierung mit konjugierten Antikörpern .....	32
2.2.6	Messung verschiedener Zeitpunkte nach Stimulation und Versuche mit Wortmannin, TPA und Prostaglandin D2 .....	32
2.2.7	Messung und Auswertung der Zellen .....	32
<b>2.3</b>	<b>Immunpräzipitation unbekannter Antigene .....</b>	<b>36</b>
2.3.1	Proteinlysat von KU812- Zellen .....	36
2.3.2	Immunpräzipitation .....	36
2.3.3	SDS- PAGE .....	37
<b>2.4</b>	<b>NanoHPLC-ESI-MS .....</b>	<b>38</b>
<b>2.5</b>	<b>Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1	Screening der Reaktivität der Workshopantikörper auf ruhenden und aktivierten Basophilen .....	40
3.2	Identifizierung neuer Aktivierungsmarker .....	53
3.2.1	Expression der neuen Aktivierungsmarker auf KU812- Zellen.....	53
3.2.2	Identifizierung der Spezifität von Antikörper 80274 und 80280.....	54
3.3	CD164 als Aktivierungsmarker auf Basophilen .....	56
3.3.1	Reaktivität verschiedener CD164 Antikörper mit Basophilen.....	56
3.3.2	Aktivierungskinetik von CD164 .....	57
3.3.3	Allergeninduzierte Hochregulierung von CD164 bei einem Lischgrasallergiker .....	60
3.4	CD13 als Aktivierungsmarker auf Basophilen .....	62
3.5	CD107a und CD107b als Aktivierungsmarker auf Basophilen .....	64
3.5	Vergleich der verschiedenen Aktivierungsmarker .....	66
3.5.1	Vergleich der anti-IgE Aktivierungskinetiken.....	66
3.5.2	Vergleich der TPA Aktivierungskinetiken .....	66
3.5.3	Stimulation mit Prostaglandin D2.....	68
3.5.4	Inhibition mit Wortmannin .....	69
3.6.5	Konfokale Lasermikroskopie.....	72

*Inhaltsverzeichnis III*

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
	<b>Bezugsquellenverzeichnis.....</b>	<b>102</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AND	Anaphylactic Degranulation
bright+	aktivierte Basophile, die ein Antigen hochreguliert haben
BSA	bovines Serum-Albumin
Btk	Bruton's tyrosine kinase
CD	Cluster of Differentiation
D	Dalton
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-NPP3	Ectonucleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3
ERK	Extracellular Signal-Related Kinases
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter= Durchflusszytometer
FcγRIIB	IgG-Rezeptor
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FL1	Fluoreszenz 1
FL2	Fluoreszenz 2
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FSC	Forward Scatter
GAB2	GRB2 associated binding protein 2
GAP	GTPase activating protein
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
JNK	Jun amino-terminal kinase
LAT	Linker for activation of T cells
low+	ruhende Basophile, die für ein Antigen positiv sind
LPR	Late Phase Response/Reaction
LTC4	Leukotrien C4
M	Mol/Liter
MAPK	Mitogen activated protein kinase

MC	Mastzellen
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
PB	Primärblut (= venöses Vollblut)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phycoerythrin
Phlp	Phleum pratense
PI-3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKC	Protein-Kinase C
PLC $\gamma$	Phospho-Lipase C $\gamma$
PMD	Piecemeal Degranulation
PtdInsP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
SCF	Stem Cell Factor
SH2-Domäne	Src homology 2-Domäne
SHIP	Src-homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5' phosphatase
SI	Stimulationsindex
SLP76	SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa
SOS	Son of sevenless
SSC	Side Scatter
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate
WTN	Wortmannin



# 1 Einleitung

## 1.1 Allergische Erkrankungen und die Bedeutung basophiler Granulozyten

*... canst thou quake, and change thy colour,  
Murder thy breath in the middle of a word,  
And then begin again, and stop again,  
As if thou wert distraught and mad with terror?*

William Shakespeare, Richard III.

Dieses Zitat beschreibt die typischen Symptome einer anaphylaktischen Reaktion. Die täuschend echte Darstellung durch den englischen König Richard III. (1483-1485) beruhte keinesfalls auf einem herausragenden schauspielerischen Talent. Der Monarch litt vielmehr unter einer Nahrungsmittelallergie gegen Erdbeeren, die er nach Shakespeare politisch geschickt zu nutzen wusste. Durch den Verzehr einiger Erdbeeren überzeugte er seinen Hof, dass ein in Ungnade gefallener Lord ihn verhexen wolle, woraufhin dieser per Lynchjustiz sofort enthauptet wurde.

Der Begriff Allergie wurde 1906 durch den Wiener Pädiater Clemens von Pirquet eingeführt. Allergische Erkrankungen zeigen in den westlichen Industrienationen einen raschen Anstieg der Prävalenz. In Schweden z.B. hat sich die Prävalenz bei Kindern innerhalb von 12 Jahren verdoppelt. Am häufigsten kommen dabei Allergien gegen Hausstaubmilbenallergene (*Dermatophagoides pteronyssinus*) vor. Die Ursache dieser Zunahme wird häufig mit der verminderten Antigenexposition unserer westlichen Kultur in Verbindung gebracht. Dabei spielen Faktoren wie exzessive Hygiene, Antibiotika im frühen Kindesalter oder Impfungen eine Rolle. Daneben gibt es aber auch genetische Veranlagungen, wie bestimmte HLA-Allele oder Polymorphismen des hochaffinen IgE-Rezeptors [56].

Normalerweise führt die Reaktion des Immunsystems auf ein Antigen zu einer Th1-Zell-vermittelten Reaktion mit der Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  und der Bildung von IgG1 und IgG4 Antikörpern. Atopiker, Menschen mit einer Anlage zu allergischen Reaktionen, bilden gegen einige Substanzen IgE Antikörper. Dies wird durch Th2-Zellen und die Bildung von bestimmten Cytokinen, wie Interleukin 4 und 13 vermittelt. Diese sind neben den Costimulatoren CD40 und dessen Ligand CD154 entscheidend für die Transkription von IgE in B-Zellen [56].

Die IgE vermittelte allergische Reaktion lässt sich in zwei Phasen einteilen: Zunächst kommt es innerhalb von Minuten zu einer lokalen, durch Mastzellen vermittelten Entzündungsreaktion, die in Abhängigkeit von der Allergenmenge nach ca. 6- 9 Stunden von einer Spätreaktion (late-phase-reaction= LPR) gefolgt wird. Nach Bindung des Allergens durch IgE-Antikörper, die an hochaffine IgE-Rezeptoren auf Mastzellen gebunden sind, kommt es durch Quervernetzung dieser Rezeptoren zur Ausschüttung einer Vielzahl von Mediatoren. Dabei wird auch Tryptase freigesetzt, die proteaseaktivierte Rezeptoren auf Endothelien und Epithelien stimuliert, was zur Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen führt [56]. Diese vermitteln unter anderem die Einwanderung von Basophilen und Eosinophilen in das

betroffene Gewebe, die dann die allergische Reaktion weiter unterhalten. Die transendotheliale Migration von Basophilen wird dabei in erster Linie durch Eotaxin und  $\beta 1$ -Integrine vermittelt [50]. Basophile produzieren auch Th2-typische Mediatoren wie IL-4 und IL-13 und exprimieren den CD40 Liganden, der für den Klassenwechsel in B- Zellen zur Produktion von IgE wichtig ist [9, 34, 56, 59, 88, 96].

Neben der etablierten Funktion bei allergischen LPRs könnten Basophile auch bei anderen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass sie Magenmucosa infiltrieren, die mit *Helicobacter pylori* infiziert ist. Bestimmte Peptide des Bakteriums sind dabei chemotaktische Reize für Basophile [26].

## **1.2 Eigenschaften basophiler Granulozyten**

### **1.2.1 Entdeckung und Entstehung**

Ein Jahr nach seiner Entdeckung der Mastzellen beschrieb Paul Ehrlich im Jahr 1879 erstmals basophile Granulozyten [29, 30]. Ebenso wie Mastzellen zeichnen sie sich durch ihre auffälligen, mit basischen Farbstoffen anfärbbaren Granula aus. Mit nur 1% aller Leukozyten, stellen Basophile die kleinste Granulozytensubpopulation des peripheren Blutes dar. Bei Allergikern kann sich ihre Zahl allerdings verdoppeln. Sie sind mit ihrem Durchmesser von ungefähr 10-14 $\mu$ m auch die kleinste Granulozytenspezies [53]. Während Mastzellen als unreife Vorläuferzellen das Knochenmark verlassen und sich im normalen Bindegewebe verschiedener Organe spezifisch differenzieren, erhalten Basophile bereits im Knochenmark ihre terminale Differenzierung und zirkulieren

im peripheren Blut. Erst aufgrund bestimmter chemotaktischer Signale verlassen sie die Blutbahn [88].

Lange Zeit hielt man Basophile für eine Form zirkulierender Mastzellen. Als sicher gilt inzwischen, dass Mastzellen nicht aus reifen Basophilen hervorgehen [96]. Beide entstehen aus CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen. Das wichtigste Cytokin für die Differenzierung Basophiler ist Interleukin 3 (IL-3). Mastzellen benötigen dagegen für die Differenzierung SCF (= stem cell factor, auch als c-kit Ligand bezeichnet) [34]. Die genaue Identität der Basophilen-Stammzelle ist nicht abschließend geklärt. *In vitro* Untersuchungen bzw. Experimente mit Leukämiezelllinien ergaben einerseits Hinweise auf eine gemeinsame Vorläuferzelle von Basophilen und Eosinophilen, andererseits auf eine Gemeinsame Entwicklung von Basophilen und Megakaryozyten [4]. Die Möglichkeit eines gemeinsamen Ursprungs von Basophilen und Mastzellen legt der Oberflächenmarker CD203c nahe. Dieser erkennt neben reifen Mastzellen und Basophilen eine gemeinsame Vorläuferpopulation dieser Zellen. Diese Möglichkeit wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass bei manchen Allergikern Zellen mit einem gemischten Basophilen-Mastzellen Phänotyp beobachtet werden [4].

### **1.2.2 Phänotyp**

Basophile exprimieren ein charakteristisches Muster von Oberflächenmolekülen, das sich deutlich von dem auf Mastzellen oder Eosinophilen unterscheidet. Neben den basophilenspezifischen Markern Bsp-1 und BB1 exprimieren Basophile im Gegensatz zu Mastzellen in hohem Maße CD123, einen Rezeptor für IL-3. Die Expression von c-kit (CD117) ist hingegen im Vergleich zu Mastzellen sehr gering [4].

Die Oberflächenmarker lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen, die im Folgenden tabellarisch aufgelistet sind. Marker die von Basophilen, nicht aber von Mastzellen exprimiert werden sind mit \* gekennzeichnet:

**Cytokinrezeptoren:** IL1-R2 (CD121b)\*, IL2-R (CD25)\*, IL3-R (CD123), IL4-R (CD124), IL5-R (CD125), IL8-R (CD128), IL18-R, GM-CSFR (CD116), IFN- $\alpha/\beta$ R (CD118), IFN- $\gamma$ R (CD119), NGFR related (CD40)\*

**Chemokinrezeptoren:** CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 (CD195), CXCR1 (CDw128a), CXCR2 (CDw128b), CXCR4 (CD184), CRTH2

**Immunglobulinrezeptoren:** Fc $\epsilon$ RI, FC $\gamma$ RII (CD32w).

**Komplementrezeptoren:** CR1\* (CD35), CR2 (CD21), CR4 (CD11c), C5aR (CD88), MCP (CD46), DAF (CD55), MAC1F (CD59)

**Adhäsionsmoleküle:**

1. Integrine:  $\beta$ 1 common (CD29), VLA-1 (CD29+CD49a), VLA-3 (CD29+CD49c), VLA-4 (CD29+CD49d), VLA-5 (CD29+CD49e),  $\beta$ 2 common (CD18)\*, LFA-1 (CD18+CD11a)\*, C3biR/Mac-1 (CD18+CD11b)\*, p150 (CD18+CD11c), Pgp-1 (CD44)

2. Selektine: Lewis-x/Lex (CD15s), L-selectin/LAM-1 (CD62L), P-selectin/PSGL-1 (CD162)\*

3. Andere Adhäsionsmoleküle: ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), PECAM (CD31)\*, LFA-3 (CD58), Leukosialin (CD43)

**Andere:** Basophil activation antigen (CD63), DRAP27/MRP-1 (CD9), Aminopeptidase N (CD13)\*, Lactosylceramid (CDw17)\*, Dipeptidylpeptidase IV (CD26), Leukocyte common antigen (CD45), Neurophilin/IAP (CD47), activation inducer molecule/AIM (CD69), MIC2 gene product (CD99), PETA-3 (CD151), BST-1 (CD157), MGC-24v (CD164), E-NPP3 (CD203c), Bsp-1\*, BB1\*, 212H6\*

[1, 4, 10, 12, 13, 40, 42, 75, 101, 107, 109, 118]

## **1.3 Aktivierung basophiler Granulozyten**

### **1.3.1 Signaltransduktion über den hochaffinen IgE-Rezeptor**

Sowohl Basophile als auch Mastzellen exprimieren den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI. Auf diesen Zellen liegt er als Tetramer, bestehend aus α-, β- und zwei γ-Untereinheiten vor. Er kommt auch auf anderen Zellen vor, z.B. auf Monozyten. Diese exprimieren aber nur α- und γ-Untereinheiten [88]. Zur Aktivierung kommt es, wenn zwei Rezeptoren durch die Quervernetzung des rezeptorgebundenen IgE mit einem Antigen (Allergen) miteinander verbunden werden. Die nähere Charakterisierung der Signaltransduktionsmechanismen, die in Abbildung 1 graphisch dargestellt sind, verwendet Daten aus verschiedenen experimentellen Systemen. Pharmakologische Untersuchungen mit verschiedenen Inhibitoren zeigen aber, dass die dargestellten Signalkaskaden vermutlich auch bei der Basophilenaktivierung beteiligt sind [71]. Der genaue Mechanismus der Aktivierung des Rezeptorkomplexes ist ausführlich untersucht worden [31, 52, 57]. Dabei spielt offenbar auch die räumliche Organisation und damit die fokale Konzentration von Signalmolekülen in Membrankompartimenten eine wichtige Rolle [36]. Durch die Quervernetzung des Rezeptors kommt es zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase Lyn und Syk. Lyn katalysiert die Phosphorylierung von ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) in den β- und γ-Untereinheiten des Rezeptors, wodurch weitere Lyn-Moleküle und Syk binden können. Diese Bindung wird über phosphotyrosinbindende Domänen (SH2 domain= src homology 2 domain) vermittelt. Syk wird von Lyn phosphoryliert und dadurch aktiviert [106].

Ein Substrat von Syk ist das Adapterprotein LAT (=linker for activation of T cells), das unter anderem GRB2 (= growth factor receptor bound protein 2) bindet. Dieses aktiviert SOS (son of sevenless), ein Nukleotidaustauschfaktor,

der die GTPase Ras aktiviert. Diese führt schließlich zu einer Aktivierung der ERK MAPK-Kaskade (ERK= extracellular signal regulated kinase; MAPK= mitogen activated protein kinase). ERK spielt eine zentrale Rolle für die Synthese des Lipidmediators Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>). Über einen ähnlichen Mechanismus kommt es zur Assemblierung von LAT, SLP76 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa) und dem Nukleotidaustauschfaktor VAV, der die GTPase Rac aktiviert. Diese aktiviert die Kaskaden der MAP- Kinasen JNK (Jun amino-terminal kinase) und p38. Die MAP-Kinase p38 vermittelt unter anderem die Produktion der Cytokine IL-4 und IL-13 [43, 55].

Ein weiteres Substrat von Syk ist GAB2 (= GRB2 associated binding protein 2). Über eine SH2 Domäne bindet die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) an das tyrosinphosphorylierte GAB2 und wird so an die Plasmamembran transloziert. Dort wird sie durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert und katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdInsP<sub>3</sub>). Phospholipase C<sub>γ</sub> (PLC<sub>γ</sub>) bindet nun über eine phospholipidbindende PH Domäne (PH domain= Pleckstrin homology domain) an dieses Lipid und wird durch die Tyrosinkinase Btk (= Bruton's tyrosine kinase) aktiviert. PLC<sub>γ</sub> spaltet PtdInsP<sub>3</sub> in die Signalmoleküle Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> vermittelt die Ausschüttung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum, welches gemeinsam mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Diese spielt im Zusammenhang mit Calcium eine zentrale Rolle für die Degranulation. Ein weiteres, direktes Substrat der PI3-Kinase ist PDK1, eine Kinase die unter anderem Akt aktiviert. Akt hat in vielen Zellen eine wichtige antiapoptotische Funktion [55, 106].

Ein Mechanismus der negativen Regulation dieses Systems wird über den IgG-Rezeptor Fc $\gamma$ RIIB vermittelt. Über ein allergenspezifisches IgG wird er mit dem aktivierten Fc $\epsilon$ RI-Komplex verbunden. Die Tyrosinkinase Lyn kann hierdurch ein im Carboxyterminus des IgG-Rezeptors befindliches ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) phosphorylieren. Dies

ermöglicht die Bindung der Inositolphosphatase SHIP (Src-homology 2-domain containing inositol polyphosphate 5' phosphatase) und des Adapterproteins DOK1. Durch die Hydrolysierung der Inositolphosphate wird die Bindung von PI3K, PLC und Akt an die Plasmamembran, und damit die Aktivierung unterbrochen. DOK1 aktiviert das die GTPase-Aktivität von Ras stimulierende Protein RasGAP (=Ras GTPase activating protein). Durch die Hydrolysierung des an Ras gebundenen Guanosintrisphosphat zu Guanosinmonophosphat wird Ras deaktiviert. Daneben spielt vermutlich auch die Bindung von Tyrosinphosphatasen an die phosphorylierten ITAMs des FcεRI eine Rolle [89].

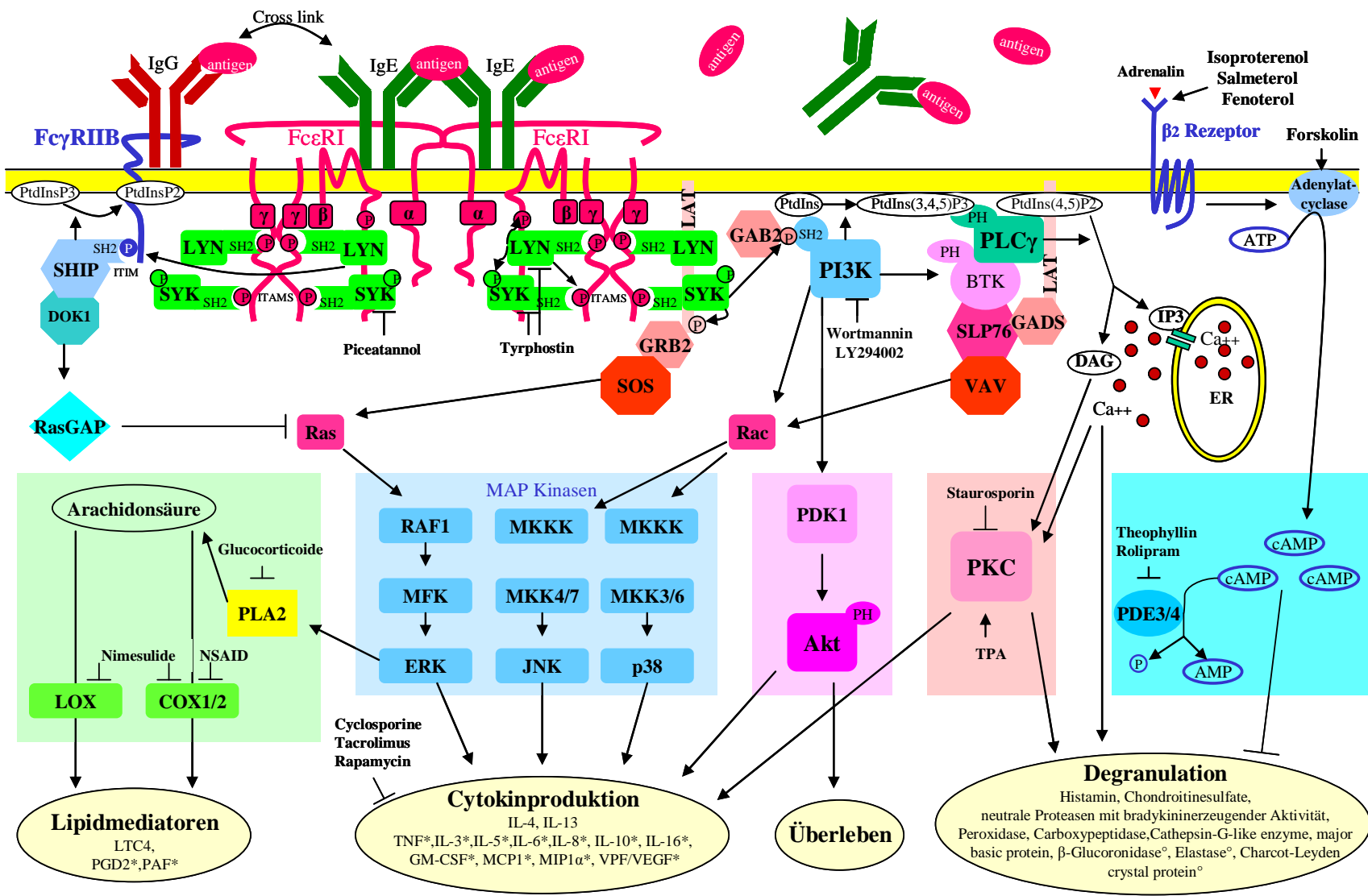
Neben diesem allergeninduzierten Mechanismus gibt es noch weitere, die z.B. bei der Stimulation mit IL-3 aktiviert werden. Es wurde auch ein Effekt verschiedener Pharmaka, die das intrazelluläre cAMP beeinflussen, gezeigt. Diese Signalkaskade ist mit einigen dieser Wirkstoffe ebenfalls in Abbildung 1 gezeigt [32, 71].

**Abbildung 1 Schema der intrazellulären Signaltransduktion in basophilen Granulozyten und Mastzellen (Seite 11)**

Zur Erläuterung siehe Text und Abkürzungsverzeichnis. Die Produkte von Basophilen und Mastzellen unterscheiden sich zum Teil; nur von Basophilen ausgeschüttete Produkte sind mit °, solche die nur von Mastzellen ausgeschüttet werden sind mit \* gekennzeichnet.

Modifiziert nach Kawakami et al [55].





### **1.3.2 Degranulation**

Histomorphologisches Hauptmerkmal der Aktivierung von Basophilen ist die Degranulation. Dabei wird eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt, die sich in drei Gruppen einteilen lassen [55]:

1. In Granula gespeicherte Mediatoren wie Histamin, Chondroitinsulphat, neutrale Proteasen mit bradykinininduzierender Aktivität, Peroxidase, Carboxypeptidase A, Cathepsin G-like Enzym, major basic protein,  $\beta$ -Glucuronidase, Elastase, Charcot-Leyden crystal protein.
2. Lipidmediatoren: Leukotrien C<sub>4</sub>.
3. Cytokine: Interleukin 4 und Interleukin 13.

Mastzellen unterscheiden sich auch hier zum Teil deutlich von Basophilen. Sie bilden unter anderem ein wesentlich breiteres Spektrum an Cytokinen [55, 81].

Ein neues sekretorisches Produkt erkennt der Antikörper BB1. Dieser wurde 1999 von Walls et al. als basophilenspezifischer Antikörper entwickelt [75]. Die Identifizierung des Antigens, das sie auf Grund der Lokalisation in den basophilen Granula Basogranulin nannten, hat sich als außerordentlich schwierig erwiesen. Offenbar ist es Bestandteil eines Proteinkomplexes mit einer Größe von ungefähr 2,000,000 Dalton [76]. Basogranulin wird nach Aktivierung der Zellen mit anti-IgE Antikörper oder einem Calciumionophor sezerniert [76, 81]. Während die Histaminausschüttung bis ca. 30 Minuten nach der Stimulation zunimmt, erreicht Basogranulin bereits nach 15 Minuten ein Maximum. Ein Teil lässt sich dabei durchflusszytometrisch auch auf der Zelloberfläche nachweisen [81].

Die klassische Degranulation erfolgt durch Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran. Dieser Vorgang wird auch als anaphylaktische Degranulation (AND) bezeichnet. 1973 beschrieb Ann Dvorak erstmals Basophile, die teilweise entleerte Granula und zahlreiche kleine Vesikel

zwischen diesen Granula und der Plasmamembran enthielten [24]. Einige dieser Vesikel waren mit den Granulamembranen oder der Plasmamembran verschmolzen. Sie bezeichnete diese Form der „stückweisen“ Granulaentleerung als Piecemeal-Degranulation (PMD). PMD wurde daraufhin auch bei Mastzellen und Eosinophilen beschrieben. In einer Vielzahl chronisch entzündlicher Läsionen, in denen diese Zellen vorkommen, ist PMD ein Hauptsekretionsmechanismus [24]. Ex vivo lässt sich der PMD-Phänotyp in Basophilen durch Aktivierung mit verschiedenen Stimuli erzeugen. TPA, ein Aktivator der Proteinkinase C ist in der Lage, PMD über einen längeren Zeitraum zu induzieren. AND wird bei TPA-Stimulation dagegen verspätet und vermindert beobachtet. Bei anti-IgE-Aktivierung zeigen die Zellen nach 2 Minuten deutlich PMD, nach 7 Minuten fast ausschließlich AND. Bei der allergenvermittelten Aktivierung kommt es also zunächst zu vorübergehender PMD, gefolgt von AND [28]. Welche physiologischen Stimuli den anhaltenden PMD-Phänotyp von Basophilen in chronisch entzündlichen Läsionen aufrechterhalten ist derzeit noch unbekannt. Ebenfalls völlig unbekannt ist, welche Signalmechanismen bei der Induktion von PMD beteiligt sind.

## **1.4 Aktivierungsmarker basophiler Granulozyten**

Die Aktivierung von Basophilen wird von Veränderungen der Expression von Oberflächenmolekülen begleitet. Einige dieser so genannten Aktivierungsmarker sind dabei auch schon auf ruhenden Basophilen deutlich nachweisbar und zeigen eine eher schwache Hochregulierung nach Stimulation. Hierzu zählen Moleküle wie CD11b, CD11c, CD18, CD26, CD35 und CD45. Eine Ausnahme bildet CD203c, das zwar auch auf ruhenden Basophilen deutlich vorhanden ist, aber stark hochreguliert wird. Bislang ist CD63 der einzige Marker, der auf ruhenden Basophilen nicht, bzw. nur schwach

vorhanden ist, und erst nach Aktivierung auf der Zelloberfläche erscheint. Andere Moleküle zeigen dagegen nach Aktivierung eine verminderte Oberflächeexpression wie CD31, CD62L und CD162 (PSGL-1) [9,11].

Neben den beiden wichtigsten Aktivierungsmarkern, CD63 und CD203c, soll im Folgenden näher auf die in dieser Arbeit erstmals als Basophilen-Aktivierungsmarker beschriebenen Moleküle CD107a, CD107b, CD164 und CD13 eingegangen werden.

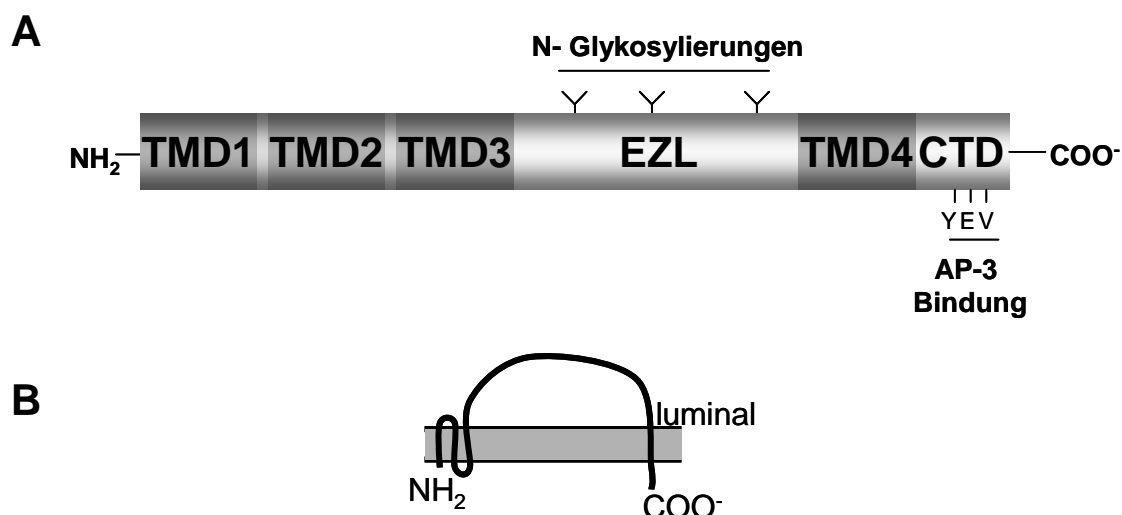
### **1.4.1 CD63**

CD63, auch als LIMP, MLA1, PTLGP40, gp55, Granulophysin, LAMP-3, ME491, oder NGA bezeichnet, ist ein Mitglied der Familie der Tetraspanine (TSTF= tetraspan transmembrane family oder auch TM4SF= transmembrane 4 superfamily). Diese Familie zeichnet sich strukturell durch vier Transmembrandomänen (TMD), zwei ungleiche extrazelluläre Schleifen (= Loops) und den kurzen, jeweils zytoplasmatisch lokalisierten Amino- und Carboxyterminus aus. Weitere Tetraspanine sind CD9, CD53, CD81, CD82 und CD151. Die meisten Gewebe exprimieren mehrere dieser Moleküle, mit Ausnahme von Erythrozyten. Funktionell sind sie in unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie Zelladhäsion und Signaltransduktion beteiligt [105]. Im Rahmen der Zelladhäsion spielen sie unter anderem eine wichtige antimetastatische Rolle [94].

CD63 hat, wie alle Tetraspanine, eine Vielzahl von Bindungspartnern mit denen es auf der Plasmamembran große Komplexe formt. Solche Komplexe wurden unter anderem beschrieben mit CD11 und CD18 [99],  $\alpha^3\beta_1$ -Integrin und CD9 [7] und mit VLA-3 und VLA-6 Integrinen [6]. In Neutrophilen wurde auch eine mit dem Komplex assoziierte Tyrosinkinaseaktivität beschrieben [99].

Aufgrund dieser „organisierenden“ Eigenschaften, werden sie als „molecular facilitators“ betrachtet [69].

Neben der aktivierungsabhängigen Expression auf der Plasmamembran findet sich CD63 vor allem in lysosomalen Membranen, für die es in der kurzen carboxyterminalen Domäne (CTD) ein spezifisches Zielsignal enthält [78]. Dieses Signal mit der Sequenz Glycin-Tyrosin-Glutamat-Valin bindet an die  $\mu$ 3-Untereinheit des Adapterkomplexes AP-3, der unter anderem auch für die lysosomale Lokalisation von CD107a wichtig ist [63, 91]. In Basophilen ist es mit der Granulamembran assoziiert, mit der es bei der Degranulation an die Zelloberfläche transloziert wird [58, 76, 78]. Ursprünglich als Aktivierungsmarker für Thrombozyten beschrieben, hat sich die Detektion von CD63 auf aktivierten Basophilen besonders in der durchflusszytometrischen Diagnostik von Allergien als hilfreich erwiesen [58, 102].



**Abbildung 2 Schemazeichnung der Struktur von CD63**

**A:** CD63 besteht aus vier Transmembrandomänen (TMD1-4), zwei extrazytoplasmatischen Loops (EZL) und einer carboxyterminalen Domäne (CTD). Der erste EZL zwischen TMD1 und 2 ist sehr kurz und in der Grafik nicht

extra bezeichnet. Der EZL zwischen TMD3 und 4 trägt die N- Glykosylierungen von Asparaginresten. Die CTD beinhaltet das lysosomale Zielsignal Tyrosin(Y)- Glutamat(E)- Valin(V), das an den Adapterproteinkomplex AP-3 bindet.

**B:** Vereinfachte Darstellung der räumlichen Organisation von CD63. Amino- und Carboxyterminus sind beide cytoplasmatisch orientiert. Die glykosylierte EZD ist in Granula luminal und in der Plasmamembran extrazellulär orientiert.

### **1.4.2 CD107a/ LAMP-1 und CD107b/LAMP-2**

CD107a und CD107b, auch als LAMP-1 und LAMP-2 (LAMP= lysosomal associated protein) bezeichnet, sind ubiquitär exprimierte Glykoproteine. Als Hauptbestandteil lysosomaler Membranen (ca. 50%), bilden sie gemeinsam bis zu 0,2% des gesamten Eiweißgehaltes einer Zelle [3, 21, 23, 38].

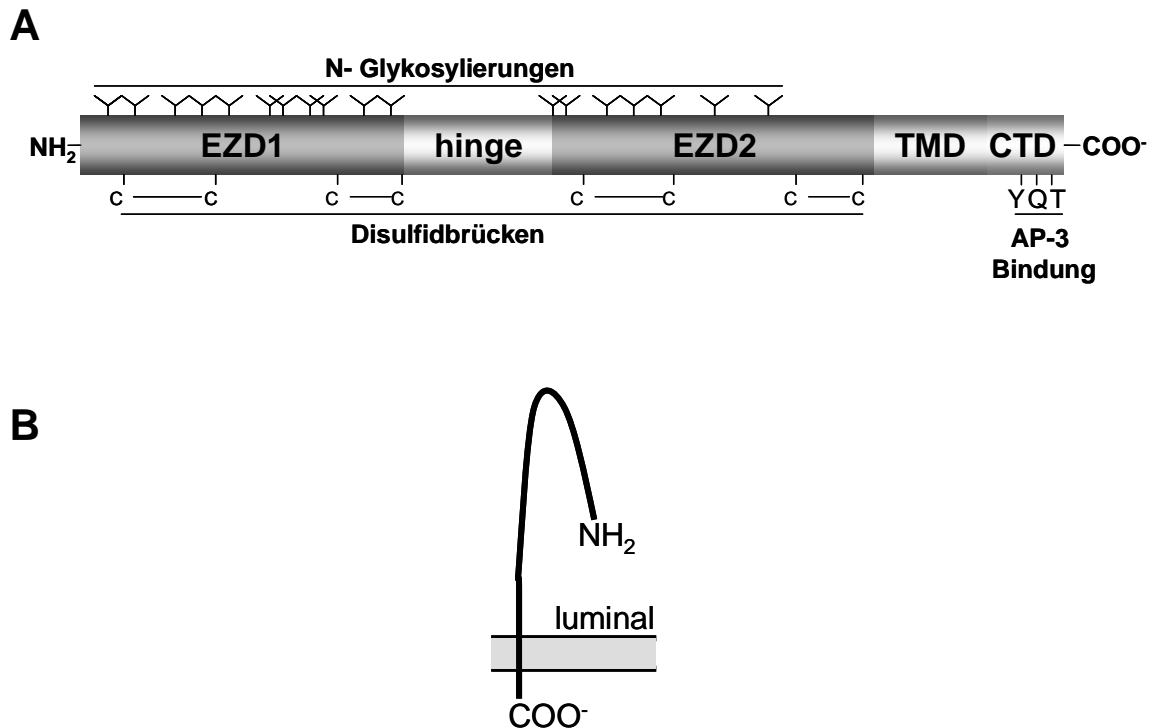
Der Proteinkern von CD107a besteht aus 385 Aminosäuren, mit einem ungefähren Molekulargewicht von 40kD [112]. Durch die gewebespezifische Glykosylierung an insgesamt 18 Asparaginresten schwankt die Masse des Gesamtmoleküls zwischen 115-160kD [23]. Das Gen befindet sich auf Chromosom 13q34, das von CD107b auf Chromosom Xq24-25 [74]. Beide Moleküle weisen eine ähnliche Größe und Struktur auf: Der größte Teil des Moleküls wird durch die beiden extrazytoplasmatischen Domänen (EZD) gebildet. Diese tragen eine Vielzahl von Glykosylierungen, und sind durch eine bewegliche Scharnierregion (hinge) miteinander verbunden. Über eine Transmembrandomäne (TMD) sind sie mit der kurzen, cytosolischen carboxyterminalen Domäne (CTD) verbunden. Diese enthält ein lysosomales Zielsignal mit der Sequenz Tyrosin-Glutamin-Threonin, das mit dem AP-3 Adapterkomplex interagiert [63]. Eine ähnliche AP-3 bindende Domäne findet sich auch am C- Terminus des ansonsten strukturell vollständig verschiedenen CD63 [20, 45, 63, 91, 117].

LAMP-1 und 2 finden sich innerhalb der Zelle fast ausnahmslos in lysosomalen Membranen [23]. Eine aktivierungsabhängige Translokation an die Zelloberfläche wurde zuerst auf Thrombozyten, später auch auf Monozyten, zytotoxischen T-Zellen und FMLP-aktivierten neutrophilen Granulozyten beobachtet [35, 54, 66, 92, 98]. In Neutrophilen sind sie mit sekretorischen Vesikeln, nicht aber mit azurophilen Granula assoziiert [25]. Kürzlich wurden LAMP-1 und LAMP-2 als Aktivierungsmarker für Mastzellen beschrieben. Interessanterweise fanden die Autoren, trotz des ähnlichen Zielsignals, fluoreszenzmikroskopisch keine Kollokalisierung mit CD63 [44].

Auch nach intensiver Forschung ist die Funktion dieser Moleküle immer noch unklar. Aufgrund ihrer Menge bedecken sie vermutlich mit ihren Kohlehydraten vollständig die innere Lysosomenmembran. Es wurde vermutet, dass sie die Membran so vor aggressiven Enzymen schützen [37]. Die Glykosylierungen sind außerdem Träger von N-Acetyllactosaminen, welche E-Selektin-bindende Epitope bilden können. Damit wären LAMPs auch Adhäsionsmoleküle. Dies könnte ihre Expression auf besonders metastatischen Tumorzellen und auf aktivierten peripheren Blutzellen erklären [95, 41]. In der Tat vermittelt LAMP-2 die Adhäsion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes an Endothelien [54].

Der Morbus Danon, eine außerordentlich seltene lysosomale Speicherkrankheit, wird verursacht durch Mutationen des LAMP-2-Gens auf Chromosom Xq24-25 [85]. Histomorphologisch ist er durch die intrazelluläre Akkumulation von autophagozytischen Vakuolen gekennzeichnet, klinisch durch das Auftreten von Kardiomyopathien und Myopathien. LAMP-2 Knock-out-Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp und eine erhöhte Sterblichkeit [103]. LAMP-1 Knock-out-Mäuse haben hingegen kaum pathologische Veränderungen. Das Fehlen des Proteins wird durch die Überexpression von LAMP-2 kompensiert [3]. Doppel-Knock-out-Mäuse sterben hingegen um den 15. Tag der Embryonalentwicklung. Die Lysosomenfunktion scheint auch hier

nicht grundlegend gestört zu sein. Embryonale Zelllinien dieser Mäuse zeigen aber eine Akkumulation von Cholesterol [33].



### Abbildung 3 Schemazeichnung der Struktur von CD107a/LAMP-1

A: CD107a besteht aus zwei extrazytoplasmatischen Domänen (EZD1 und 2), eine Transmembrandomäne (TMD) und eine kurze carboxyterminale Domäne (CTD). Die beiden EZDs sind über eine variable „Scharnierregion“ (hinge) verbunden. Sie tragen viele N- Glykosylierungen, und ihre Struktur wird über Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten (C) stabilisiert. Die CTD enthält die lysosomale Zielsequenz Tyrosin(Y)-Glutamin(Q)-Threonin(T), die den Adapterproteinkomplex AP-3 bindet.

B: Vereinfachte Darstellung der räumlichen Organisation von CD107a. Die kurze CTD ist zytoplasmatisch orientiert, der N- Terminus luminal, bzw. extrazellulär.



### **1.4.3 CD203c**

CD203c ist eine Ektonukleotidpyrophosphatase/-phosphodiesterase (E-NPP) und wird als drittes Mitglied dieser Familie auch als E-NPP3 bezeichnet. Weitere Namen sind PD-I $\beta$ , B10, gp130<sup>RB13-16</sup> und PDNP3. E-NPPs spalten Phosphodiester und Phosphosulphate [19].

Das Gen ist auf Chromosom 6q22 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit 875 Aminosäuren. Es handelt sich um ein Klasse II Transmembranprotein. Den N-Terminus bildet die kurze cytoplasmatische Domäne, gefolgt von einer Transmembrandomäne (TMD). Dieser schließen sich zwei somatomedinähnliche Domänen (SLD1 und 2), die katalytische Domäne (CD) und am Carboxyterminus eine endonukleaseähnliche Domäne (ELD) an [19].

Im hämatopoetischen System wird CD203c nur von Basophilen, Mastzellen und deren Vorläufern exprimiert [17, 18]. Daneben findet es sich auch in Uterus, Prostata und Kolonkarzinomen [19, 121].

Über die biologische Funktion ist nur wenig bekannt. Ein monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von CD203c blockiert die Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Knochenmarkszellen zu Basophilen und Mastzellen, was auf eine wichtige Rolle bei der Differenzierung dieser Zellen hinweist. Auf reifen Basophilen hat es möglicherweise eine adhäsive Funktion [19].

Als Basophilen- Aktivierungsmarker hat CD203c in der durchflusszytometrischen Diagnostik verschiedener Allergien zunehmend an Bedeutung gewonnen [8, 46]. Die Vorteile gegenüber dem klassischen Basotest, der eine Kombination von IgE und CD63 als Marker verwendet, liegen einerseits in der Spezifität von CD203c für Basophile. Außerdem scheint CD203c in der Diagnostik sensitiver zu sein. Dies wird allerdings derzeit noch kontrovers diskutiert [14, 116].

Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind vergleichende Untersuchungen zur Regulation von CD203c und CD63 [19, 70]. So wurde gezeigt, dass die Hochregulierung von CD203c wesentlich schneller erfolgt, als die von CD63. Die Expression von CD203c erreicht dabei bereits nach ca. 5 Minuten ein Maximum, während die von CD63 bis ca. 15- 20 Minuten weiter ansteigt. Nach Stimulation mit TPA zeigen Basophile eine rasche Hochregulation von CD203c. CD63 wird dagegen erst nach 40- 60 Minuten schwach hochreguliert. Dabei sind beide Moleküle offenbar von der PI3- Kinase abhängig, da Wortmannin die Hochregulierung dosisabhängig inhibiert [19]. Interessant ist die Beobachtung, dass eine Inkubation von Basophilen mit den HMG-CoA-Reduktasehemmern Atorvastatin und Cerivastatin zu einer verminderten Hochregulierung von CD203c nach anti-IgE Stimulation führt. Für CD63 wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Die Inkubation von KU-812 Zellen, einer basophilen Leukämiezelllinie, führte zur verminderten Expression von CD203c und zu einer erhöhten Expression von CD63 und CD117 [70].



#### Abbildung 4 Schemazeichnung der Struktur von CD203c/ENPP-3

CD203c besteht dem kurzen, zytoplasmatischen N- Terminus, einer Transmembrandomäne (TMD), zwei somatomedinähnlichen Domänen (SLD1 und 2), der katalytischen Domäne (CD) und einer endonukleaseähnlichen Domäne (ELD) am carboxyterminalen Ende.

#### **1.4.4 CD164/ MGC- 24**

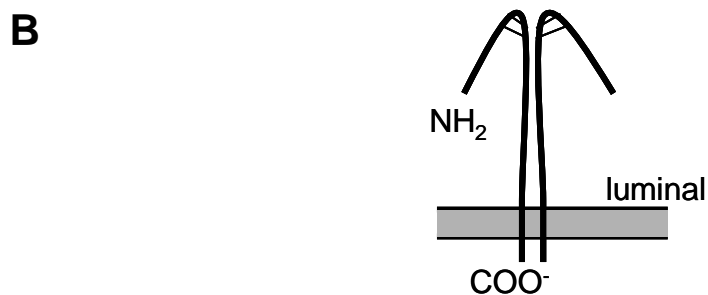
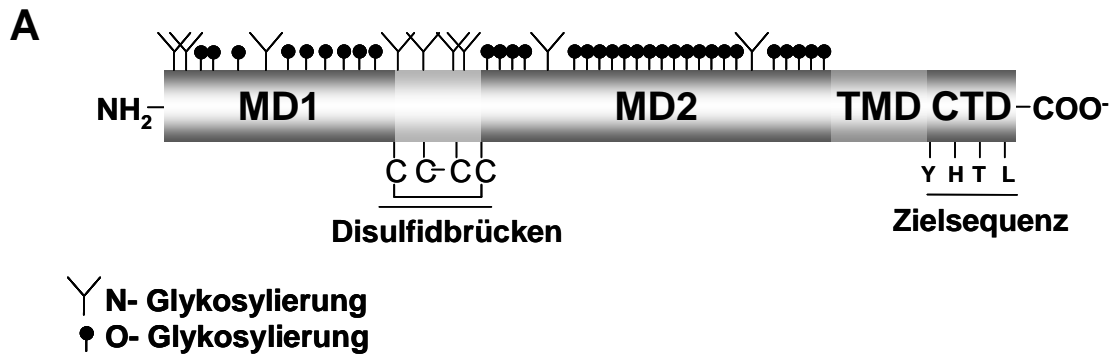
1992 beschrieben Masuzawa et. al. erstmals ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 24kD, das sie aus Magenkarzinomzellen isoliert hatten und das eine weit verbreitete Expression zeigte [72]. Einige Zeit später isolierten Zannettino et al. den cDNA-Klon eines 80- 90 kD schweren Transmembranproteins, das sich als Isoform des von Masuzawa beschriebenen, löslichen MGC-24 (multiglycosylated core protein of 24kD) herausstellte. Das neue Protein wurde als hämatopoetischer Stammzellmarker identifiziert und als CD164 geclustert [16, 123].

CD164 gehört in die Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle (CAM= cell adhesion molecule). Diese unterteilen sich aufgrund struktureller und funktioneller Eigenschaften in verschiedene Gruppen wie Integrine, Cadherine, Selectine, Immunglobuline und Sialomuzine. Zu letzterer Gruppe zählen vor allem Glykoproteine des hämatopoetischen Systems und auf Epithelien und Endothelien exprimierte Moleküle. Neben CD164 gehören zu den Sialomuzinen auch GlyCAM-1, CD34, CD162, MadCAM-1, CD43, CD45RA, CD68 und CD96. Sie zeichnen sich in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz durch eine ausgeprägte Heterogenität aus und werden aufgrund ihres hohen Gehaltes an Prolin, Threonin und/ oder Serin und der mit diesen Aminosäuren verknüpften Kohlenhydratresten klassifiziert [114, 123].

Das CD164-Gen ist auf Chromosom 6q21 lokalisiert. Es besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Differentielles Spleißen führt zu drei mRNA-Varianten, wobei die vollständige Form mit allen sechs Exons (CD164(E1-6)) die vorwiegend exprimierte ist. Dieses Transkript findet sich ubiquitär in einer Vielzahl menschlicher Gewebe und codiert für ein Typ I Transmembranprotein. Es besitzt zwei extrazelluläre Muzindomänen, eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne [22, 60, 114]. Auch aus Maus und Ratte sind cDNAs kloniert worden, die als MGC-24v bzw. Endolyn bezeichnet werden [22, 49].

Die Funktion von CD164 ist im Einzelnen noch ungeklärt. Es wurde gezeigt, dass monoklonale Antikörper gegen CD164 die Adhäsion an Knochenmarksstroma sowie die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen hemmen. Das Molekül fungiert also vermutlich als Homingrezeptor für Stammzellen und hat außerdem einen Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion. Bis heute ist allerdings kein physiologischer Ligand beschrieben [114, 123]. CD164 wird auf besonders unreifen Stammzellen mit CD34 koexprimiert. Die Darstellungen mithilfe der konfokalen Lasermikroskopie auf der Oberfläche von primitiven hämatopoetischen Stammzellen zeigen eine hohe Kolo-kalisation mit CD34 in ringförmigen Ansammlungen, mit Verdichtungen an den Adhäsionspunkten mit dem Objektträger [77]. Allerdings ist der Großteil des Proteins intrazellulär in Endosomen und Lysosomen lokalisiert [22]. Für das orthologe Rattenprotein konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Sequenz im zytoplasmatischen Schwanz hierfür zuständig ist [49]. Lee et al. fanden heraus, dass CD164-Überexpression zur Differenzierung von Myoblasten führt, während die Depletion des Proteins die Differenzierung inhibiert [65] und Matsui et. al. fanden einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Metastasierung kolorektaler Karzinome und einer verminderten Expression von CD164 [73].

Die starke Glykosylierung eröffnet durch die unterschiedliche Expression von Glykosyltransferasen die Möglichkeit zelltypspezifischer posttranslationaler Modifikationen. Die vier verschiedenen monoklonalen Antikörper gegen CD164 (105.A5, 103.B2, 67D2 und N6B6) sind von der Glykosylierung des Proteins abhängig, und zeigen in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedliche Reaktivitäten [114, 123].



### Abbildung 5 Schemazeichnung der Struktur von CD164

**A:** CD164 besteht aus zwei Muzindomänen (MD1/2), einer Transmembrandomäne (TMD) und der kurzen carboxyterminalen Domäne (CTD). Die beiden MDs sind über eine kurze Region verbunden, die über Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten (C) stabilisiert wird. Der gesamte extrazytoplasmatische Teil des Moleküls ist stark O- und N-glykosyliert. Die CTD enthält die Sequenz Tyrosin(Y)-Histidin(H)-Threonin(T)-Leucin(L), die vermutlich als Zielsignal für die lysosomale Lokalisation dient.

**B:** Vereinfachte Darstellung der räumlichen Organisation von CD164. Die CTD ist zyttoplasmatisch orientiert, der N-Terminus luminal, bzw. extrazellulär. Das Molekül liegt als Homodimer vor. Die Stellung der MDs wird durch die zwei Disulfidbrücken fixiert.

### **1.4.5 CD13/ Aminopeptidase N**

CD13, auch als Aminopeptidase N oder gp150 bezeichnet, gehört in die Familie der zinkabhängigen Metalloproteasen. Es handelt sich um ein Typ II Transmembranprotein mit 967 Aminosäuren, das stark O- und N-glykosyliert ist. Diese posttranslationalen Modifikationen sind vermutlich zelltypspezifisch, da verschiedene monoklonale Antikörper gewebeabhängig unterschiedliche Reaktivitäten zeigen. Auf der Zelloberfläche liegt es als Homodimer vor. Die extrazellulär gelegene enzymatische Domäne katalysiert die Abspaltung einzelner Aminosäuren vom N-Terminus des Substrats. CD13 wird sowohl von frühen Vorläufern als auch von reifen Monozyten und Granulozyten exprimiert. Weiterhin findet sich das Molekül auf einer Vielzahl von Geweben, unter anderem auf Endothelien, Epithelien und auf Knochenmarksstromazellen [126].

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlichster Erkrankungen, mit denen die dysregulierte Expression des Moleküls assoziiert ist. Dazu zählen die akuten myeloischen Leukämien, Pankreascarcinome und multiple Sklerose [51, 104, 125]. Hierbei scheint CD13 durch die Degradierung von Matrixstrukturen eine wichtige Rolle für die Invasivität der Zellen zu spielen [90]. Außerdem regt es die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) an [5, 86], spielt eine Rolle in der Zellzyklusregulation [67] und schützt Zellen vor Apoptose [80]. Besondere Bedeutung hat CD13 für die Virologie, da es als Rezeptor für verschiedene Coronaviren und das Cytomegalievirus dient [100, 122].

Die physiologische Bedeutung des Moleküls auf Leukozyten ist noch weitgehend ungeklärt [67]. Der Großteil der Untersuchungen bezieht sich auf monozytäre Zellen. Auf diesen Zellen konnte gezeigt werden, dass CD13 mit so genannten lipid rafts („Lipidflösse“) assoziiert ist, komplexartig organisierter Einheiten aus verschiedenen Molekülen auf der Plasmamembran [84]. Die Bedeutung von CD13 liegt sowohl in seiner enzymatischen Aktivität als Ektopeptidase, als auch in seiner Funktion als Rezeptor. Obwohl noch kein

natürlicher Ligand beschrieben werden konnte, führt die Bindung monoklonaler Antikörper in Monozyten zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums und zur Aktivierung von MAP-Kinasen [93]. In Endothelzellen führt die Aktivierung dieser Signalkaskade zur Transkription des CD13 Gens [87]. Die Expression auf monozytoiden Zellen ist zellzyklusabhängig, und Inhibition der Enzymaktivität, bzw. Bindung monoklonaler Antikörper führt zu einer Verlangsamung des Zellzyklus [67]. Eine erhöhte Oberflächenexpression wurde auf bronchoalveolären eosinophilen Granulozyten von Asthmatikern nach Allergenstimulation beschrieben (ca. 2- 3 fache Erhöhung) [15]. Für die Expression auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wurde ein Zusammenhang mit der extrazellulären Prozessierung von Antigenen, die von T-Zellen auf MHCII-Molekülen präsentiert werden, gezeigt [62].

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der Arbeit war es, die Reaktivitäten von über 250 Antikörpern, die im Rahmen des 8. Internationalen Leukozytenworkshops (HLDA8) zur Verfügung standen, auf ruhenden und über FcεRI aktivierten Basophilen zu bestimmen. Dadurch sollten einerseits das Expressionsmuster der erkannten Moleküle auf Basophilen bestimmt und andererseits potentielle neue Aktivierungsmarker identifiziert werden. Solche Marker können sowohl für die durchflusszytometrische Diagnostik von Allergien hilfreich sein, als auch zum Verständnis der molekularen Grundlagen allergischer Erkrankungen beitragen.

## 2 Methoden

### 2.1 Puffer und Lösungen

#### **FACS-Puffer:**

- |                 |            |
|-----------------|------------|
| - PBS           | 500ml      |
| - 1% BSA        | 5ml, 10%   |
| - 0,1% Na- Azid | 2,5ml, 20% |

#### **TRIS pH 8,8:**

- |                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| - 1,5M Tris base                  | 91g in 500ml dH <sub>2</sub> O |
| - pH 8,8 mit HCl/ NaOH einstellen |                                |
| - 0,4% SDS                        | 2g                             |

#### **TRIS pH 6,8:**

- |                                   |                                  |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| - 0,5M Tris base                  | 6,05g in 100ml dH <sub>2</sub> O |
| - pH 6,8 mit HCl/ NaOH einstellen |                                  |
| - 0,4% SDS                        | 0,4g                             |





**30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid**

- 30% Acrylamid 30g
- 0,8% Bisacrylamid 0,8g
- dH<sub>2</sub>O auf 100ml auffüllen
- Lösung filtrieren

**Coomassie-Färbelösung**

- 50% Methanol 500ml
- 10% Essigsäure 100ml
- dH<sub>2</sub>O auf 1000ml auffüllen
- Coomassie Brilliant Blue R 2,5g

**Coomassie-Entfärbelösung**

- 15% Methanol 150ml
- 10% Essigsäure 100ml
- dH<sub>2</sub>O auf 1000ml auffüllen

**Vollmedium**

- 500ml RPMI Medium
- 50ml FCS Gold 10% (fetal calf serum)
- 5ml Penicillin/ Streptomycin
- 5ml MEM
- 5ml Na- Pyruvat 1%
- 2,5ml Monothioglycerol

## **2.2 Markierung basophiler Granulozyten aus Vollblut**

### **2.2.1 Aktivierung basophiler Granulozyten**

Für die vorliegenden Experimente wurde das Blut von gesunden Spendern verwendet. Im Fall der allergeninduzierten Aktivierung mit Lischgrasallergenen wurde nach Einverständniserklärung Blut eines entsprechenden Allergikers verwendet.

Venöses Vollblut wurde zur Gerinnungshemmung mit Lithium-Heparinat versetzt (Sarstedt Monovetten, 5,5ml). Anschließend wurde das Blut mit 0,5µg/ml eines anti-IgE-Antikörpers für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde Blut mit PBS inkubiert. Zur Aktivierung wurde ein spezieller Antikörper verwendet, der zu einer Vernetzung der IgE-Moleküle führt. Aufgrund der im Folgenden beschriebenen komplexen Markierung konnte hier nicht der gebräuchliche Mausantikörper verwendet werden, sondern es wurde ein Ziegenantikörper benutzt. Die kalziumabhängige Aktivierung der Basophilen wurde mit 20mM EDTA gestoppt. Danach wurden die Zellen für 7 Minuten bei 6°C und mit 1200 RPM zentrifugiert.

Zum Absättigen freier Immunglobulinbindungsstellen auf den Zellen wurde das Pellet mit 1mg/ml humanem Polyglobulin resuspendiert und für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich wurde die Probe 1:1,5- 1:2 mit FACS-Puffer verdünnt.

### **2.2.2 Kombinierte indirekte und direkte Markierung**

Zu PBS bzw. anti-IgE aktivierten Basophilen wurden nun jeweils 10µl des monoklonalen Mausantikörpers gegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Proben zweimal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und mit 10 $\mu$ l eines auf 60 $\mu$ g/ml vorverdünnten FITC- konjugierten Kaninchen anti-Mausantikörpers versetzt. Nach erneuter Inkubation für 15 Minuten und einmaligem Waschen mit 1ml FACS-Puffer wurde dem Ansatz mit 20 $\mu$ l einer auf 25 $\mu$ g/ml vorverdünnten Lösung von Mausimmunglobulinen zugegeben, und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im letzten Schritt wurden 10 $\mu$ l eines CD203c-PE-Konjugats (97A6) dazugegeben und die Proben für 15 Minuten auf Eis inkubiert. In Abbildung 6 ist das Prinzip dieser Markierung graphisch dargestellt.

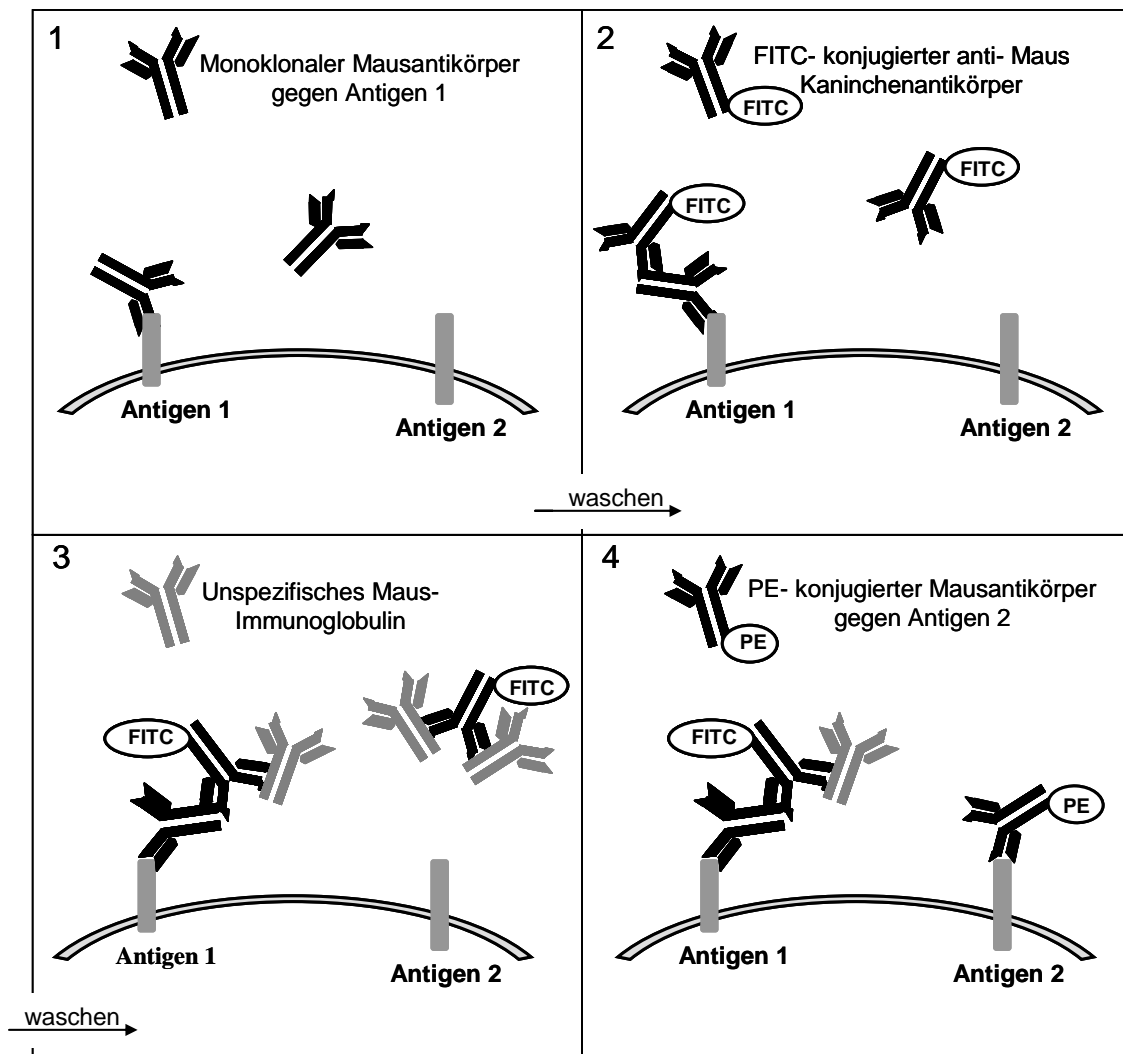
### **2.2.3 Erythrozytenlyse**

Zur Lyse der Erythrozyten und zur Fixierung der Zellen wurden 100 $\mu$ l Optilyse B dazugegeben und die Proben sofort gevortext. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden sie mit 2ml destilliertem Wasser versetzt und nach weiteren 5 Minuten abzentrifugiert (4 $^{\circ}$ C, 7 Minuten, 1200 RPM). Nach nochmaliger Inkubation mit 2ml destilliertem Wasser für 10 Minuten wurden sie einmal mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 150 $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert.

### **2.2.4 Besonderheiten der Markierung in 96-Napf Mikrotiterplatten**

Für das Screening der Workshopantikörper wurde die Markierung und Erythrozytenlyse in 96-Napf Mikrotiterplatten ausgeführt. Da das maximale Volumen eines Napfes 200 $\mu$ l fasst, mussten die Waschvolumina entsprechend

reduziert werden. Für die Messung wurden die Proben in FACS- Rörchen überpipettiert.



**Abbildung 6** Kombinierte indirekte und direkte Markierung  
 Zur Erläuterung siehe Kapitel 2.2.2 und Abkürzungsverzeichnis.

### **2.2.5 Doppelmarkierung mit konjugierten Antikörpern**

Zur Doppelmarkierung mit konjugierten Antikörpern wurden die Proben wie in 2.2.1 beschrieben vorbereitet und anschließend direkt mit beiden Konjugaten markiert. Nach 15 Minuten Inkubation erfolgte die Lyse wie in 2.2.3 beschrieben.

### **2.2.6 Messung verschiedener Zeitpunkte nach Stimulation und Versuche mit Wortmannin, TPA und Prostaglandin D2**

Bei der Messung verschiedener Zeitpunkte nach der Aktivierung mit anti-IgE wurde bei der Stimulation jeweils mit der längsten Inkubationszeit begonnen und die Reaktion wie oben beschrieben mit 20mM EDTA gestoppt. Wortmannin wurde 15 Minuten vor anti-IgE-Stimulation in einer Endkonzentration von 500nM zu den Proben gegeben. TPA wurde ebenfalls in einer Endkonzentration von 500nM eingesetzt. Für die Stimulation mit Prostaglandin D2 wurden 10µmol/Liter verwendet.

### **2.2.7 Messung und Auswertung der Zellen**

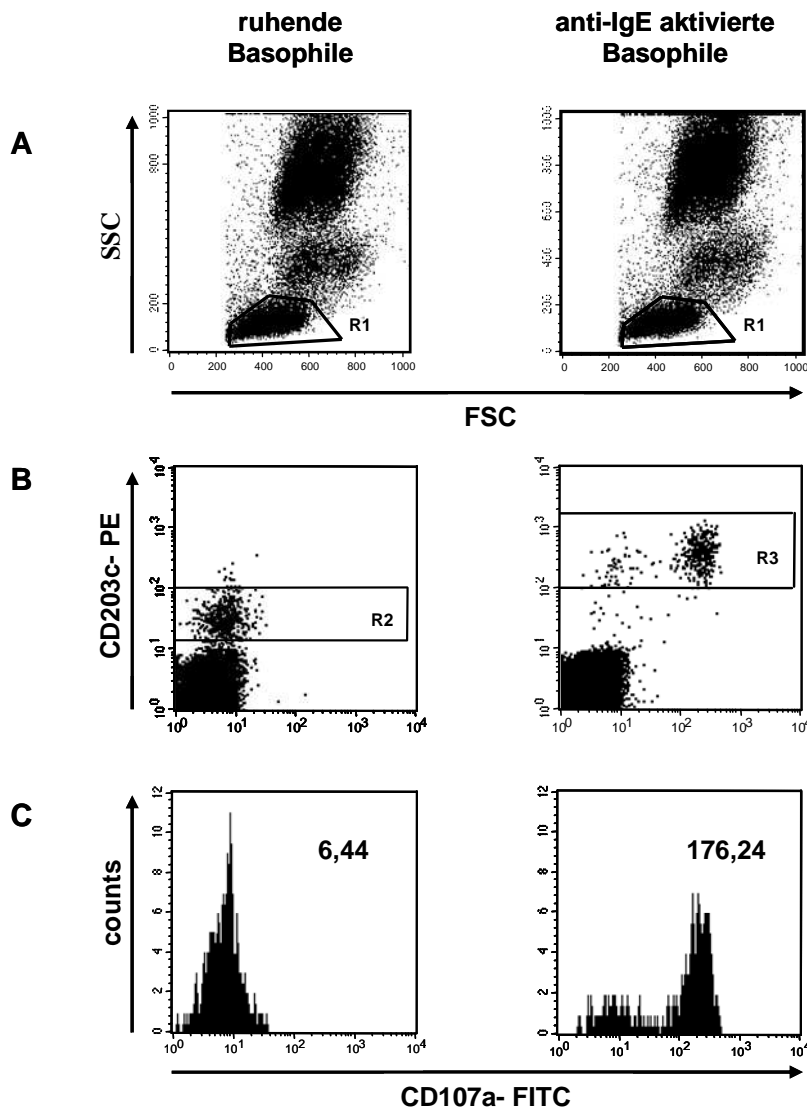
Zur Analyse der Zellen wurde ein FACSCalibur Durchflusszytometer von Becton- Dickinson verwendet. Die Auswertung erfolgte an einem Macintosh Computer mit der Cellquest Software.

Zur Quantifizierung der Antigenexpression auf der Zelloberfläche von Basophilen wurde im Scatterbild (Darstellung des Vorwärtsscatters gegen den 90° Scatter) auf die Lymphozyten gated (Abb. 7 A). Anhand der Doppel-

fluoreszenz-Darstellung wurde dann auf CD203c<sup>+</sup>- (ruhende, Gate R2) bzw. CD203c<sup>+bright</sup>- (aktivierte, Gate R3) Basophile gated (Abb. 7 B). Von Zellen in diesem Gate wurde dann die Fluoreszenzintensität bestimmt. Abbildung 7 C zeigt das Histogramm der in R2, bzw. R3 gatedeten Zellen für das FITC-Signal, und den dazugehörigen Wert der medianen Fluoreszenzintensität.

Die Berechnung des Stimationsindexes ist in Abbildung 8 A gezeigt. Hierfür wurde die mediane Fluoreszenzintensität der aktivierten Basophilen durch die der Ruhenden dividiert.

Bei der Bestimmung des Prozentanteils der Basophilen, die ein Antigen nach Stimulation hochregulieren, wurden die Basophilen in der Dot-Plot Darstellung in vier Quadranten unterteilt (Abb. 8 B). Anschließend wurde aus den absoluten Zellzahlen der relative Anteil der für ein Antigen Positiven Zellen berechnet. Dabei ergibt sich die Zahl der CD203c<sup>+</sup>-Zellen aus der Summe von Region R1 und R3 und die der CD203c<sup>+bright</sup>-Zellen aus R2 und R4. Beispielhaft für die CD164<sup>+</sup>-Zellen errechnet sich die Zahl aus der Summe von R3 und R4. Zur Bestimmung der Prozentanteile wurden die Werte wie in Abbildung 8 B dargestellt eingesetzt.



**Abbildung 7**      **Ermittlung der medianen Fluoreszenz für ein Basophilenantigen**

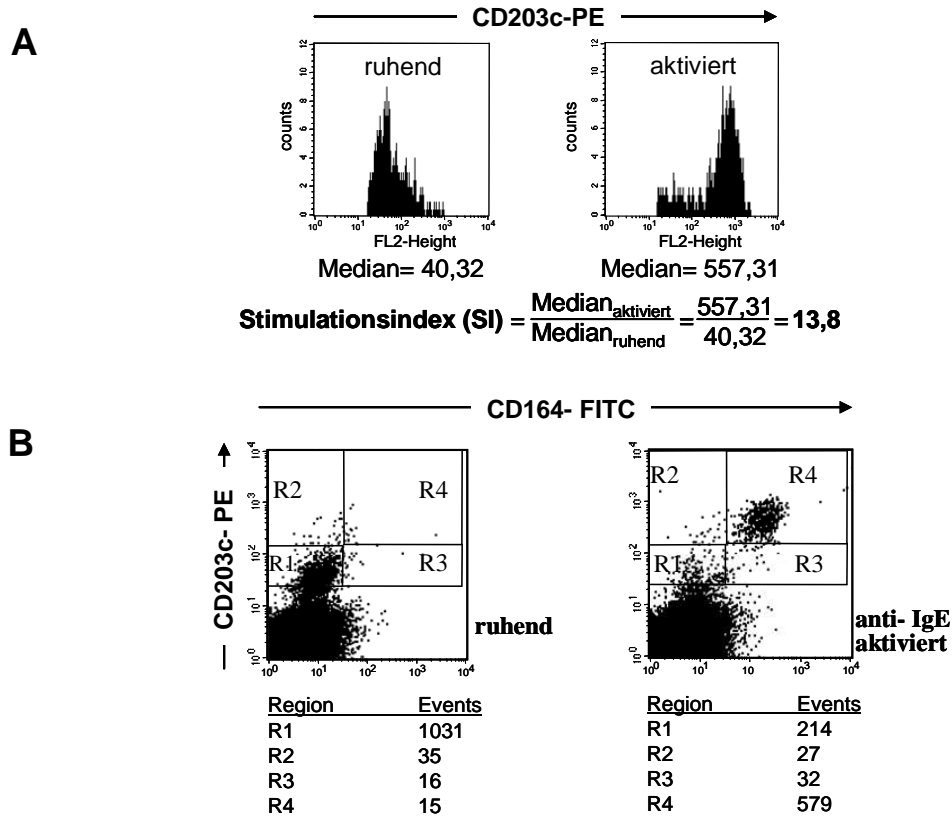
Dargestellt ist die Messung von CD203c-PE gegen CD107a-FITC.

**A:** Zunächst wurden im Scatterbild die Lymphozyten ausgewählt (Gate R1).

**B:** Im Dot-Plot zeigen sich dann in y-Richtung (PE-Signal) die Basophilen, die nach Aktivierung mit anti-IgE CD203c hochregulieren. Für ruhende und aktivierte Basophile wurde jeweils ein Gate R2 bzw. R3 gewählt, und die Fluoreszenzintensität des FITC-Signals gemessen.

**C:** Histogramme der Gates R2 und R3.





**Prozentsatz CD203c<sup>+bright</sup> auf ruhenden Basophilen=**

$$\left( \frac{(R2+ R4)_{\text{ruhend}}}{(R1+R2+R3+R4)_{\text{ruhend}}} \right) \cdot 100\% = \left( \frac{35+ 15}{1031+ 35 +16+ 15} \right) \cdot 100\% = \underline{\underline{4,6\%}}$$

**Prozentsatz CD203c<sup>+bright</sup> auf aktivierten Basophilen=**

$$\left( \frac{(R2+ R4)_{\text{aktiviert}}}{(R1+R2+R3+R4)_{\text{aktiviert}}} \right) \cdot 100\% = \left( \frac{27+ 579}{214+ 27+ 32+ 579} \right) \cdot 100\% = \underline{\underline{66\%}}$$

**Prozentsatz CD164<sup>+bright</sup> auf ruhenden Basophilen=**

$$\left( \frac{(R3+ R4)_{\text{ruhend}}}{(R1+R2+R3+R4)_{\text{ruhend}}} \right) \cdot 100\% = \left( \frac{16+ 15}{1031+ 35 +16+ 15} \right) \cdot 100\% = \underline{\underline{2,8\%}}$$

**Prozentsatz CD164<sup>+bright</sup> auf aktivierten Basophilen=**

$$\left( \frac{(R3+ R4)_{\text{aktiviert}}}{(R1+R2+R3+R4)_{\text{aktiviert}}} \right) \cdot 100\% = \left( \frac{32+ 579}{214+ 27+ 32+ 579} \right) \cdot 100\% = \underline{\underline{71\%}}$$

**Abbildung 8 Stimulationsindex und Prozentsatz positiver Zellen**

Rechenbeispiele für **A**: den Stimulationsindex und **B**: den Prozentsatz der CD203c<sup>+bright</sup>, bzw. CD164<sup>+bright</sup> Basophilen.

## **2.3 Immunpräzipitation unbekannter Antigene**

### **2.3.1 Proteinlysat von KU812-Zellen**

KU812-Zellen wurden mit Vollmedium (s. 2.1) in einem Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Nach Abzentrifugation und zwei maligem Waschen mit PBS wurden sie gezählt und auf Eis gestellt. Zur Vorbereitung wurden 10ml des verwendeten Lysepuffers (s. 2.1) mit 20µl Aprotinin 2mg/ml und 100µl PMSF 100mM versetzt. Anschließend wurde das Zellpellet in 500µl Lysepuffer/ 5·10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert und in Eppendorfgefäße überpipettiert. Mit einer gelben Kanüle und einer 1ml-Spritze wurden die Zellen 10mal auf und ab pipettiert. Nach 10 Minuten Inkubation und wiederholtem auf und ab pipettieren wurde das Lysat 30 Minuten bei 14.000 RPM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und in Kryogefäßen bei -70°C eingefroren, bzw. direkt verwendet.

### **2.3.2 Immunpräzipitation**

Der Lysepuffer wurde wie in 2.3.1 beschrieben vorbereitet und auf Eis gestellt. 25µl Protein G Sepharose Beads wurden 3mal mit jeweils 1ml des verwendeten Lysepuffers gewaschen (Abzentrifugation jeweils mit 12.000 RPM für 1 Minute bei 4°C). Zur Vorreinigung (Preclearing) wurde das Zelllysat für eine Stunde mit den gewaschenen Beads inkubiert. Nach Abzentrifugation wurden jeweils 500µl des Überstands mit 7µg gereinigtem 80274-Antikörper, 100µl E-63-Kulturüberstand, bzw. entsprechenden Mengen eines Kontrollantikörpers versetzt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit jeweils 50µl frisch gewaschenen Beads versetzt und erneut für eine Stunde

bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet 4mal mit 1ml Lysepuffer gewaschen. Für die SDS-PAGE Analyse (= Sodiumdodeacylsulphate-Polyacrylamid-Gelelectrophorese) wurden die Proben mit 25µl 6x Probenpuffer (siehe 2.1) 10 Minuten bei 100°C gekocht und nach der Abzentrifugation auf das Gel geladen.

### **2.3.3 SDS-PAGE**

Für die Gelanalyse wurde ein 10% Laemmli- Gel verwendet. Die Separation erfolgte mit dem Protean-Minigelsystem von Biorad. Zur Herstellung des Trenngels wurden 5ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (siehe 2.1), 3,75ml Tris pH8,8 (siehe 2.1) und 6,25ml dH<sub>2</sub>O gemischt. Als Katalysatoren wurden vor dem Gießen des Gels 100µl Ammoniumpersulphat 10% (APS) und 20µl TEMED dazugegeben. Die Oberkante des Gels wurde bis zum Abschluss der Polymerisation mit 1ml 100% Ethanol bedeckt. Für das Stacking (Ladegel) wurden 0,65ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 1,25ml Tris pH 6,8 (siehe 2.1), 3,05ml dH<sub>2</sub>O und zum Starten 50µl APS und 10µl TEMED verwendet. Die Separation erfolgte bei 100 Volt und max. 15mAmpere.

Zur Färbung wurde das Gel 5 Minuten in Coomassie Färbelösung (2.1) gelegt und anschließend ca. 1 Stunde mit Entfärbelösung (2.1) entfärbt.

Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in dH<sub>2</sub>O bei 4°C bis zur NanoHPLC-ESI-MS Analyse aufbewahrt.

## **2.4 NanoHPLC-ESI-MS**

Die NanoHPLC-ESI-MS Analyse wurde freundlicherweise durch das Tübinger Proteome Center von Professor A. Nordheim durchgeführt. Hier soll nur kurz das Prinzip der Messung erläutert werden.

Die ausgewählten Banden wurden mit Trypsin (Promega, Deutschland) verdaut, und die dabei entstandenen Peptidfragmente mittels HPLC (= high pressure liquid chromatography) separiert (Dionex LC Packings, Deutschland). Anschließend wurde eine ESI-MS Analyse durchgeführt (= electrospray ionization mass spectrometry). Diese Technik ermöglicht, ähnlich wie die MALDI Analyse (= matrix-assisted laser desorption/ ionisation), eine schonende Vaporisierung von Probenmolekülen. Dabei wird aufgrund elektromagnetischer Eigenschaften des Lösungsmittels ein Aerosol erzeugt, dessen Tröpfchen mit einer Größe von etwa 1nm nur jeweils ein Probenmolekül enthalten. Durch Desolvatisierung entstehen schließlich gasförmige Ionen. Die Masse dieser Teilchen kann dann mit einem TOF-Massenspektrometer (= time of flight) bestimmt werden.

Durch den Verdau mit Endoproteasen wie Trypsin, entsteht ein hochspezifisches Muster verschiedener Fragmente (mass map), das sich durch den Abgleich mit Datenbanken einem bestimmten Protein zuordnen lässt. Voraussetzung ist jedoch, dass die Sequenz des gesuchten Proteins bekannt ist. Eine Mischung verschiedener Proteine, z.B. Verunreinigungen mit Zytokeratinen, können bis zu einer bestimmten Grenze toleriert, das heißt vom Computer „herausgerechnet“ werden.

## **2.5 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie**

KU812-Zellen wurden zum Blocken der Immunglobulinrezeptoren mit 1mg/ml Polyglobulin für mindestens 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen in 100µl wurden mit einer Cytozentrifuge für 10 Minuten bei 800 RPM auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden sie in vorgekühltem Methanol für mindestens 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Die so fixierten und permeabilisierten Zellen wurden zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, danach wurden sie zum Blocken unspezifischer Bindungen in PBS mit 10% FCS (= foetal calf serum) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Antikörpermarkierung wurden die jeweiligen konjugierten Antikörper in einer Konzentration von 0,25- 1mg/ml und in einem Volumen von 40µl auf Parafilm gegeben und die Objektträger für 1 Stunde umgekehrt daraufgelegt. Anschließend wurde jeweils 3mal für 10 Minuten mit PBS/10% FCS und 3mal mit PBS gewaschen. Die leicht angetrockneten Zellen wurden mit einer Einbettlösung (NeoMount) überschichtet und mit Deckgläsern abgedeckt.

Zur Analyse wurden ein konfokales Lasermikroskop, eine Kamera und eine entsprechende Software von Leica verwendet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Screening der Reaktivität der Workshopantikörper auf ruhenden und aktivierten Basophilen**

Zur Identifizierung möglicher neuer Aktivierungsmarker wurden die Reaktivitäten von 252 monoklonalen Antikörpern jeweils auf ruhenden und aktivierten Basophilen verglichen. Die Antikörper wurden im Rahmen des Workshops der 8. Konferenz für humane Leukozytenantigene (HLDA= human leukocyte differentiation antigens) zur Verfügung gestellt. Der Workshop gliedert sich in verschiedene Sektionen. Für diese Arbeit wurden vor allem Antikörper aus den Sektionen Blind panel, Cytokine/ Chemokine und NK-Zellen verwendet.

Zur Identifizierung der basophilen Granulozyten wurde ein CD203c-(97A6) PE-Konjugat eingesetzt und die Workshopantikörper über eine indirekte Markierung mit einem FITC-Konjugat gegengefärbt. Die Aktivierung der Basophilen erfolgte mit einem vernetzenden anti-IgE Antikörper. Die Markierung wurde wie in Kapitel 2.2 beschrieben auf 96-Napf Mikrotiterplatten durchgeführt. Tabelle 1 fasst die Ergebnisse zusammen. In der ersten Spalte sind die Antikörpernummern des HLDA-Workshops aufgeführt, die zweite Spalte enthält

Angaben zu dem erkannten Antigen. In der dritten und vierten Spalte ist jeweils die mediane Fluoreszenzintensität für ruhende und aktivierte Zellen angegeben (zur Ermittlung des Medianwertes siehe Kapitel 2.2.7). Als signifikant positiv wurden nur Werte über 10 Fluoreszenzeinheiten gewertet. Außerdem wurde anhand der Dot-Plots die Qualität der Messung berücksichtigt. Die eindeutig als positiv gewerteten Antikörper sind in Tabelle 1 fett gedruckt. In Abbildung 9 sind die Dot-Plots und Histogramme von ausgewählten, positiv getesteten Antikörpern dargestellt. In den Histogrammen sind die jeweiligen Medianwerte eingetragen.

Die Antikörper 80216- 80220 sind gegen CD203c gerichtet. Da sie teilweise das gleiche Epitop wie das CD203c-PE-Konjugat erkennen, entstanden in der Doppelmarkierung Interaktionen.

**Tabelle 1    Reaktivität der Workshopantikörper auf ruhenden und anti-IgE aktivierten Basophilen**

Primäre Basophile aus peripherem Vollblut wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben markiert. Spalte 1 gibt die Antikörpernummer an, Spalte 2 das erkannte Antigen und Spalten 3 und 4 die jeweilige mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von ruhenden und aktivierten Basophilen. Positiv getestete Antikörper sind fett gedruckt.

<b>1. Sektion blind panel</b>			
<b>HLDA-Antikörper-Nummer</b>	<b>Antigenspezifizierung</b>	<b>MFI auf ruhenden Basophilen</b>	<b>MFI auf aktivierten Basophilen</b>
IgG1	Kontrolle	5,28	1,72
<b>80002</b>	<b>Neue Form von CD43</b>	<b>54,74</b>	<b>43,71</b>
80004	CD117	8,62	4,47
80018	CD138	8,43	5,88
80019	CD138	7,23	4,83
80020	TF1-,MO7-, CHO- und U937- Zellen	8,58	4,96

<b>80023</b>	<b>CD62L</b>	<b>180,24</b>	<b>134,56</b>
80032	CD109	14,92	10,65
80033	PRR2	4,03	2,08
80060	TRAIL R2	5,14	5,62
80061	TRAIL R2	4,37	2,43
80063	TRAIL R1	5,5	3,85
80064	TRAIL R1	8,54	5,05
80081	TRAIL R3	8,17	5,83
80082	TRAIL R3	7,27	6,32
<b>80094</b>	<b>Auf MER2 und Erythrozyten</b>	<b>30,23</b>	<b>56,74</b>
80095	neutrophil nuclear protein?	11,76	2,11
80096	Human MRP8/MRP14 Komplex	9,06	2,15
80097	Human MRP8/MRP14 Komplex	14,59	4,74
80098	Auf Macrophagen	4,57	4,07
80099	Auf Eosinophilen	4,74	2,83
80100	Glycoprotein mit Kell- Antigenen (CD238)	3,65	6,67
80101	ART4 Dombrock Blutgruppenantigen	9,14	2,53
80102	ART4 Dombrock Blutgruppenantigen	7,27	2,39
80103	Eventuell anti-CD75- ähnlich	3,8	3,96
<b>80104</b>	<b>anti-Rh 17</b>	<b>126,35</b>	<b>210,97</b>
80105	Anti-Xga gebunden an CD99	9,52	5,5
80115	CD125 (IL-5 Receptor)	5,19	2,67
80116	CD1d	10,56	1,81
80117	Integrin beta 1 Untereinheit	7,84	2,62
80118	CD146	5,38	2,59
80119	TAP1	6,15	1,96
80120	TAP2	4,66	2,05
80121	DC-SIGN (CD209)	6,26	2,35
80122	DC-SIGNR	7,81	3,25
<b>80123</b>	<b>CXCR2</b>	<b>25,03</b>	<b>7,33</b>
80124	CXCR3	6,98	3,02
<b>80125</b>	<b>CXCR4</b>	<b>24,8</b>	<b>18,94</b>
80126	CXCR5	7,3	3,8
80127	CXCR6	6,64	3,13
<b>80128</b>	<b>CCR1</b>	<b>39,95</b>	<b>31,06</b>
<b>80129</b>	<b>CCR2</b>	<b>44,91</b>	<b>26,66</b>
80131	CCR5	17,94	7,3
80132	CCR6	5,8	2,31
80133	CCR7	30,37	8,51
80134	CCR9	7,7	2,19
<b>80135</b>	<b>CXCR1</b>	<b>13,1</b>	<b>54,74</b>
80149	CD153	5,88	2,37
80150	NGF- Rezeptor	6,29	2,41



80151	CD88	10,23	2,81
<b>80154</b>	<b>F11 Rezeptor</b>	<b>15,54</b>	<b>16,4</b>
<b>80160</b>	<b>CD164 (N6B6)</b>	<b>41,23</b>	<b>469,76</b>
80161	CD133	4,41	3,52
<b>80162</b>	<b>CD164 (67D2)</b>	<b>18,43</b>	<b>537,61</b>
80163	SIRP- beta	4,41	3,19
80164	SIRP- beta	5,09	4,66
80165	CD203c	16,25	6,07
80166	CD109	5,83	3,6
80167	E-Cadherin	3,72	3,16
80168	Ep-CAM	4,1	5,33
80170	Auf neuronalen und mesenchymalen Stammzellen	4,78	2,27
80172	Auf neuronalen und mesenchymalen Stammzellen	4,94	3,25
<b>80173</b>	<b>CD123</b>	<b>248,05</b>	<b>255,98</b>
80174	CD56	8,74	5,09
80175	CD56	10,14	5,19
80177	CD141	8,74	3,44
80178	BDCA-2 transfizierte U937- Zellen	10,41	4,78
80179	anti-BDCA-2	9,73	5,67
80180	anti-BDCA-2	7,99	3,22
80181	CD141	7,77	2,71
80183	Neuropilin-1	8,13	4,03
80184	LIF- Rezeptor	6,98	2,71
80185	LIF- Rezeptor	7,84	4,37
80186	Calpain1	8,2	4,07
80187	CD95	10,94	4,01
80188	fMLP- Rezeptor	9,06	3,89
80191	Aminopeptidase A (APA)	7,99	3,31
80192	Auf CD4+CD8+ Thymozythen	7,32	1,89
80193	Auf dendritischen Zellen	11,44	4
80216	CD203c	3,43	2,57
<b>80217</b>	<b>CD203c</b>	<b>12,08</b>	<b>1,17</b>
<b>80218</b>	<b>CD203c</b>	<b>4,94</b>	<b>22,98</b>
<b>80219</b>	<b>CD203c</b>	<b>6,55</b>	<b>45,93</b>
<b>80220</b>	<b>CD203c</b>	<b>10,75</b>	<b>16,7</b>
80223	CD153	10,46	5
80224	CD140b	4,7	5,14
<b>80230</b>	<b>IL 18Ra</b>	<b>20,54</b>	<b>24,14</b>
<b>80231</b>	<b>IL 18Ra</b>	<b>26,9</b>	<b>16,55</b>
80264	CD130	9,91	4,66
80265	CD106	10,27	5,07
80266	CD106	10,27	3,89

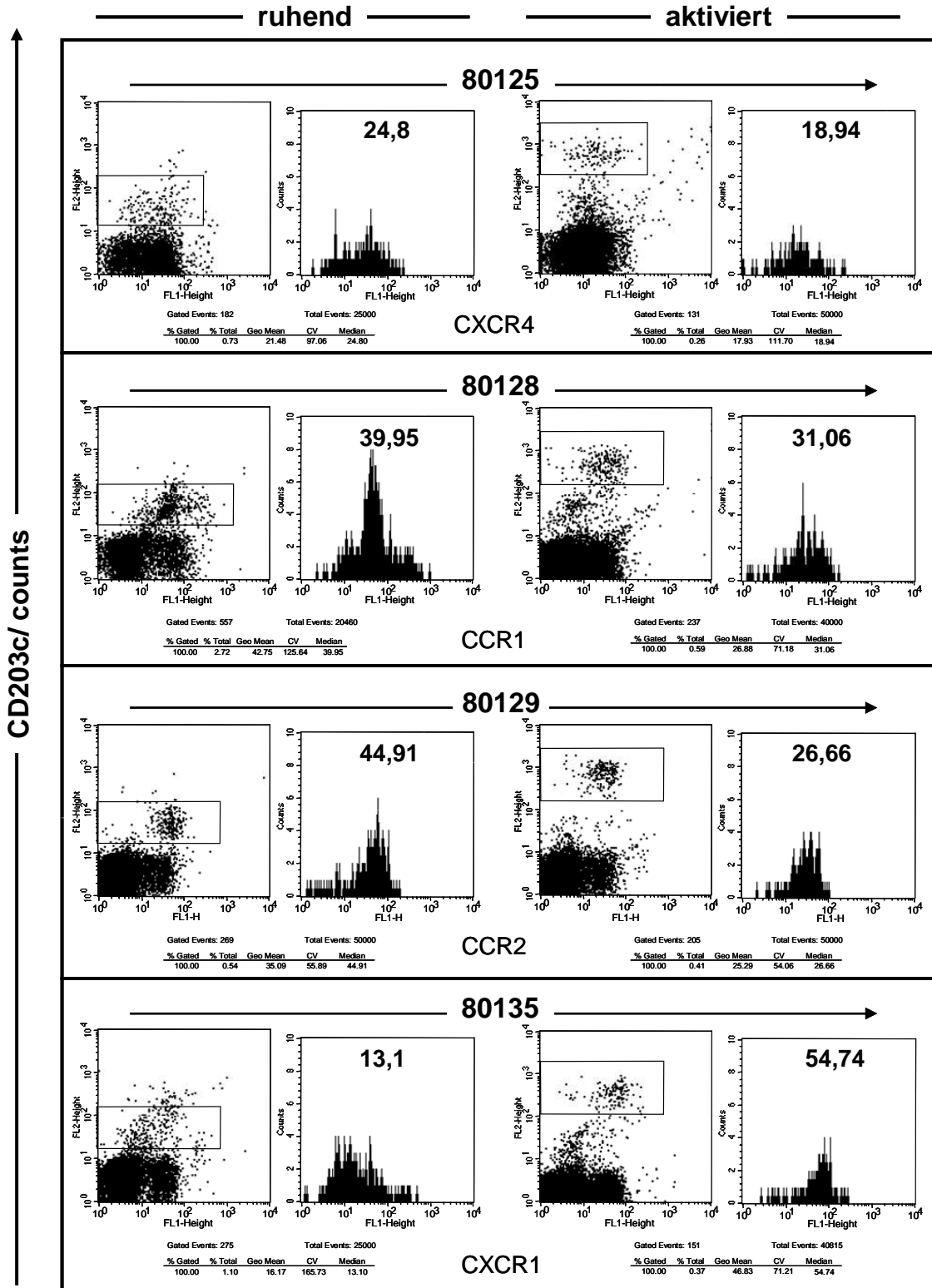
<b>80274</b>	<b>Auf Knochenmarksstromazellen</b>	<b>28,9</b>	<b>112,4</b>
<b>80275</b>	<b>Auf Knochenmarksstromazellen</b>	<b>15,26</b>	<b>15,96</b>
80276	Auf Knochenmarksstromazellen	9,18	2,48
80272	6A8 alpha- Mannosidase	8,58	3,25
<b>80280</b>	<b>Auf dendritischen Zellen</b>	<b>5,94</b>	<b>716,92</b>
<b>80281</b>	<b>CD244</b>	<b>28,77</b>	<b>25,95</b>
80282	DEC-205 (CD205)	11	5
80283	DEC-205 (CD205)	9,47	5,33
80284	DEC-205 (CD205)	15,61	7,3
80285	Auf dendritischen Zellen	7,4	2,21
80286	CD179a	7,04	3,72
80287	Siglec 6	10,46	6,73
80288	Siglec 9	7,81	5,99
<b>80289</b>	<b>EGF- Tm7</b>	<b>19,28</b>	<b>20,35</b>
80294	epithelial specific antigen	8,02	4,33
80295	Poly(ADP-Ribose) Polymerase	7,33	2,59
80296	Poly(ADP-Ribose) Polymerase	7,77	3,19
80297	Auf dendritischen Zellen	7,64	3,82
80298	Auf dendritischen Zellen	9,06	2,57
80303	Auf reifen B-Zellen	8,2	2,92
80304	Fetales Hämoglobin (HbF)	4,1	3,54
80305	ICAM-3 Rezeptor auf dendritischen Zellen	6,58	2,53
80306	Grb2- ähnliches Adaptorprotein	10,32	3,01
80307	Auf unreifen dendritischen Zellen	9,02	4,01
80308	CD205	16,25	12,52
80314	Cub domain containing protein 1 (CDCP1)	7,04	3,89
80315	Cub domain containing protein 1 (CDCP1)	4,89	3,75
80316	Cub domain containing protein 1 (CDCP1)	7,5	4,14
80317	Cub domain containing protein 1 (CDCP1)	7,33	3,96
80318	Cub domain containing protein 1 (CDCP1)	5,57	2,97
80323	ICOS Ligand	11,34	5,47
80340	natural killer cell like antigen	11,09	6,15
80341	Betakette von DP, DQ, DR	4,33	4,96
80357	Thomsen-Friedenreich Antigen	6,85	3,16
80390	NKG2D	7,81	3,72
80391	VEGF-R2 (KDR)	3,19	6,49
80392	Folliculäre dendritische Zellen	4,57	3,55
80393	Folliculäre dendritische Zellen	4,7	4,22

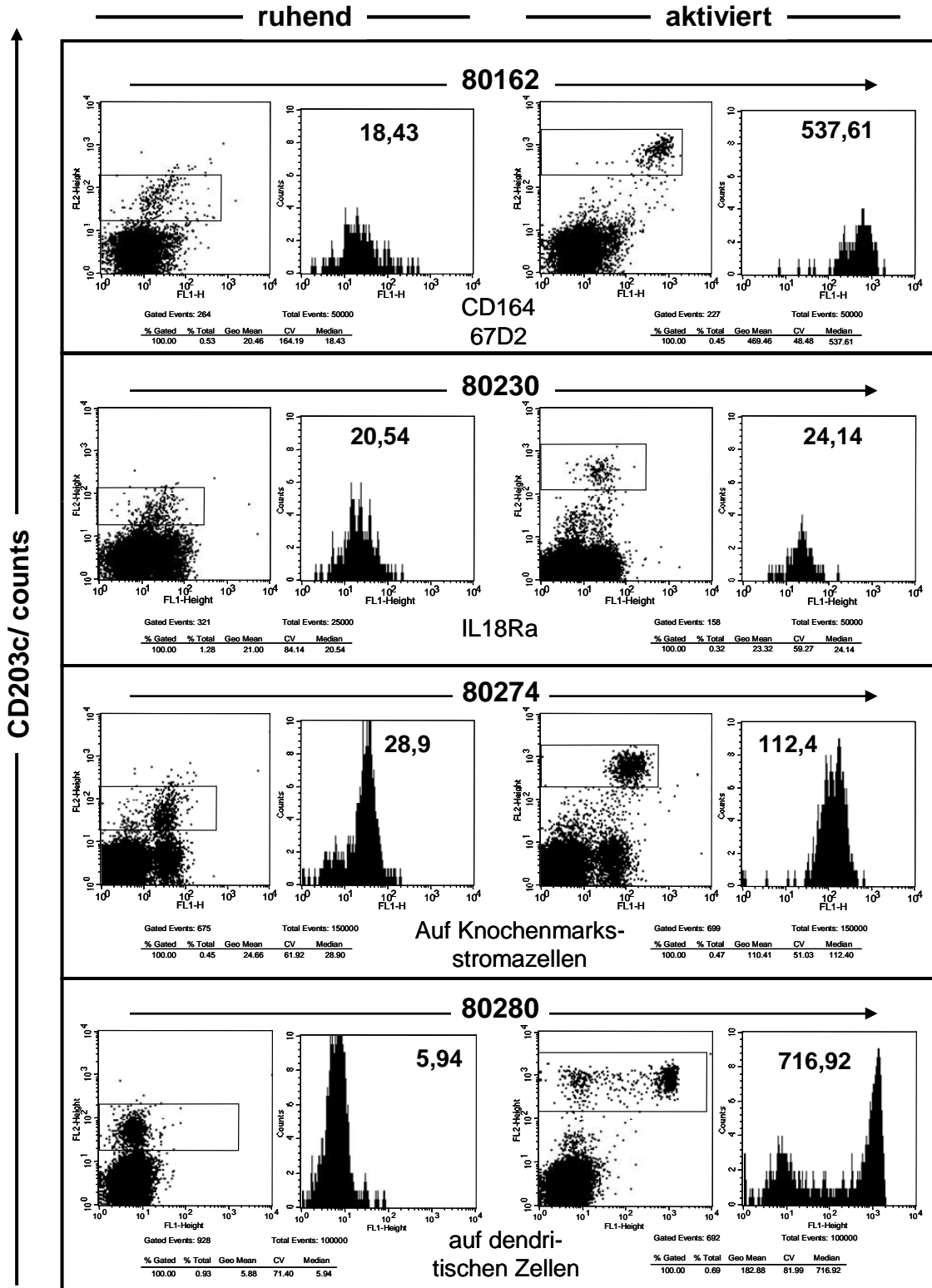
80394	Folliculäre dendritische Zellen	3,16	3,62
80426	PAI1	7,37	3,59
80427	NK-T	9,52	4,03
80428	PAI1	9,56	5,03
80429	ABCG2 (BCRP1)	9,06	4,1
80430	TWEAK R	3,19	3,75
<b>80431</b>	<b>BSP1 (basophil specific protein)</b>	<b>22,27</b>	<b>6,79</b>
80432	NKG2D	4,96	3,46
80435	Siglec-7	2,48	4
80436	MICA/B	5,47	4,45
<b>80441</b>	<b>TLR4</b>	<b>10,84</b>	<b>11,65</b>
80442	Nkp46	4,94	3,91
80443	HI302 (antigen unbekannt)	6,85	4,14
80448	CCR8	7,81	4,22
80454	OX116	3,19	4,39
<b>80455</b>	<b>OX108</b>	<b>46,56</b>	<b>102,74</b>
80459	RANK	3,59	3,62
80460	TACI	3,82	4,22
80461	TRANCE	2,56	4,87
80462	Jagged-1	3,13	3,73
80463	Leptin-R	2,75	4,53
80464	BMPR1alpha	4	4,7
80465	BMPR1alpha	3,01	4,74
80466	FGF R1	3,55	3,65
80467	FGF R2	4,68	5,47
80468	FGF R2	4,03	5,45
80469	FGF R2	4,18	5,09
80470	FGF R2	3,67	4,31
80471	FGF R3	3,52	4,59
80472	FGF R3	2,18	5,00
80473	FGF R4	3,41	4
80474	CD226	10,09	5,47
<b>80475</b>	<b>LAIR</b>	<b>35,55</b>	<b>47,83</b>
<b>80476</b>	<b>LAIR</b>	<b>27,14</b>	<b>25,48</b>
<b>80477</b>	<b>LAIR</b>	<b>22,88</b>	<b>48,25</b>
80478	TRAIL	5,67	7,53
80479	TRAIL	4,37	5,73
80480	TRAIL	4,18	6,18
80481	TACI	6,32	10,37
80482	TACI	5,52	6,64
80483	Blys	3,16	5,26
80484	Blys	4,94	4,26
<b>80485</b>	<b>Light</b>	<b>12,47</b>	<b>31,34</b>
80486	Light	4,03	7,84

<b>80488</b>	<b>Light</b>	<b>7,88</b>	<b>18,94</b>
80489	APRIL	6,92	8,82
80490	APRIL	8,86	12,41
80497	BAFF-R	3,11	5,78
80498	BAFF-R	3,31	5,65
80504	BCMA	3,09	4,49
80505	LAIR2	3,92	6,15
<b>80506</b>	<b>LAIR2</b>	<b>7,77</b>	<b>19,28</b>
80507	LAIR2	4,37	5,52
80508	LAIR2	5,83	7,91
80509	TRAIL-R4	3,96	3,79
80510	TRAIL-R4	5,62	7,17
80511	TRAIL-R3	4,68	8,9
80512	TRAIL-R2	5,78	4,35
80513	TRAIL-R2	3,13	3,64
80515	EpCAM	5,03	3,11
80516	EpCAM	5,45	2,94
80517	EpCAM	3,01	3,48
80525	NKP44	3,19	3,28
80526	NKP30	3,98	8,74
80527	NKP46	3,16	5,67
80528	NKG2D	6,41	4,41

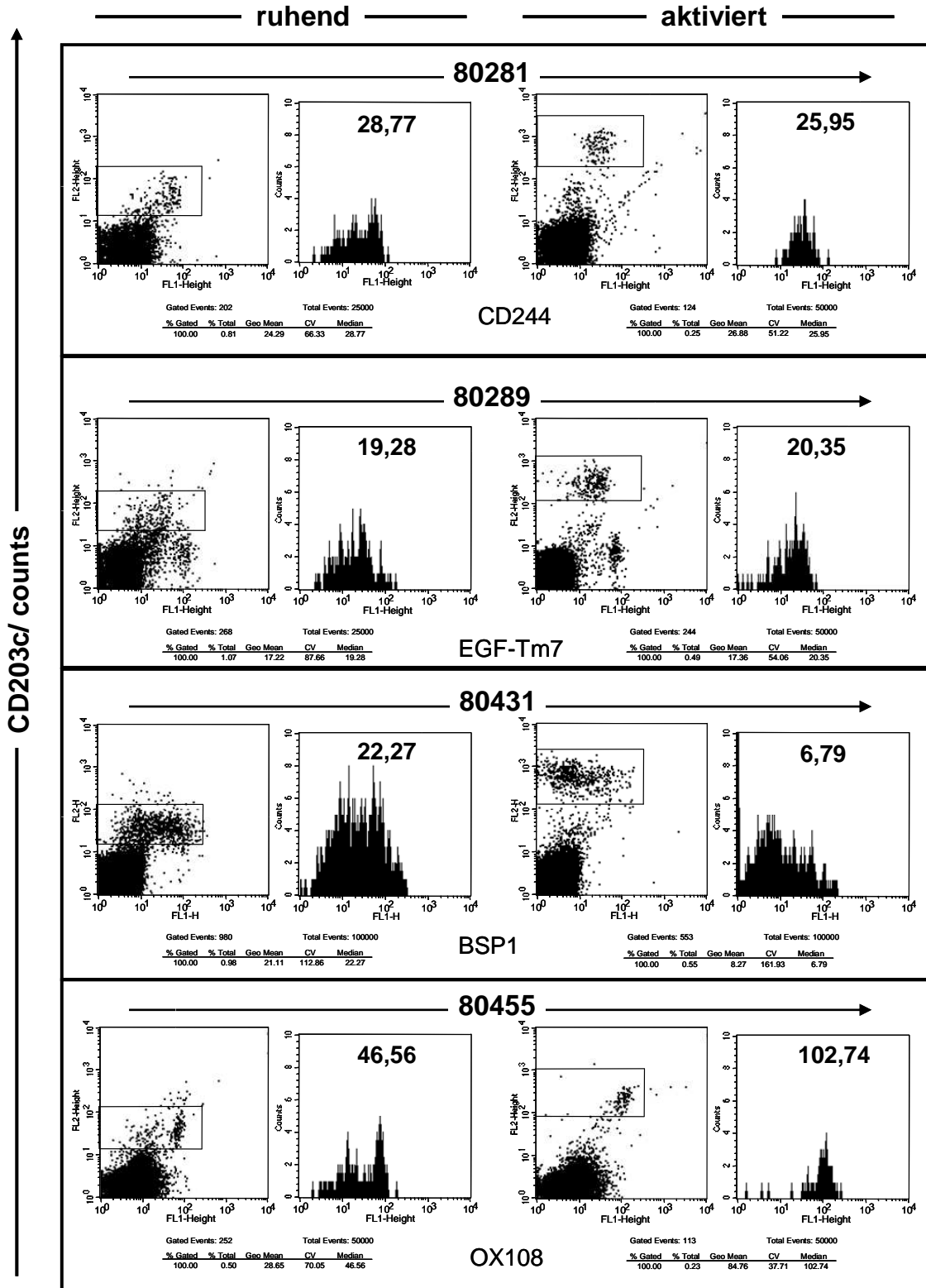
2. Sektion Cytokine/Chemokine			
HLDA Antikörper Nummer	Antigenspezifizierung	MFI auf ruhenden Basophilen	MFI auf aktivierten Basophilen
80061	TRAIL R2	9,73	3,91
80062	TRAIL R2	4,53	4,53
80065	TRAIL R2	5,14	3,59
80069	TRAIL R1	4,35	4,01
80072	TRAIL	4,18	4,61
80075	TRAIL	4,37	4,68
80077	TRAIL R1	4,16	2,55
80083	TRAIL R5	8,7	4,45
80087	TRAIL R4	4,22	2,79
80089	TRAIL R4	4,78	4,53
80123	CXCR2	3,92	5,52
80124	CXCR3	4,49	2,89
<b>80125</b>	<b>CXCR4</b>	<b>22,27</b>	<b>16,85</b>
80126	CXCR5	6,32	3,68
80127	CXCR6	7,14	3,34
<b>80128</b>	<b>CCR1</b>	<b>40,5</b>	<b>24,36</b>
<b>80129</b>	<b>CCR2</b>	<b>35,87</b>	<b>27,14</b>
80131	CCR5	9,56	3,34
80132	CCR6	8,13	4,22
80133	CCR7	10,99	3,89
80134	CCR9	11,44	3,43
<b>80135</b>	<b>CXCR1</b>	<b>18,27</b>	<b>20,72</b>
80184	LIF Rezeptor	12,19	4,43
80185	LIF Rezeptor	7,99	4,26
80228	IL18Ra	4,45	5,67
<b>80232</b>	<b>IL18Rb</b>	<b>13,16</b>	<b>13,7</b>
<b>80438</b>	<b>IL18Ra, alpha c</b>	<b>13,1</b>	<b>10,94</b>

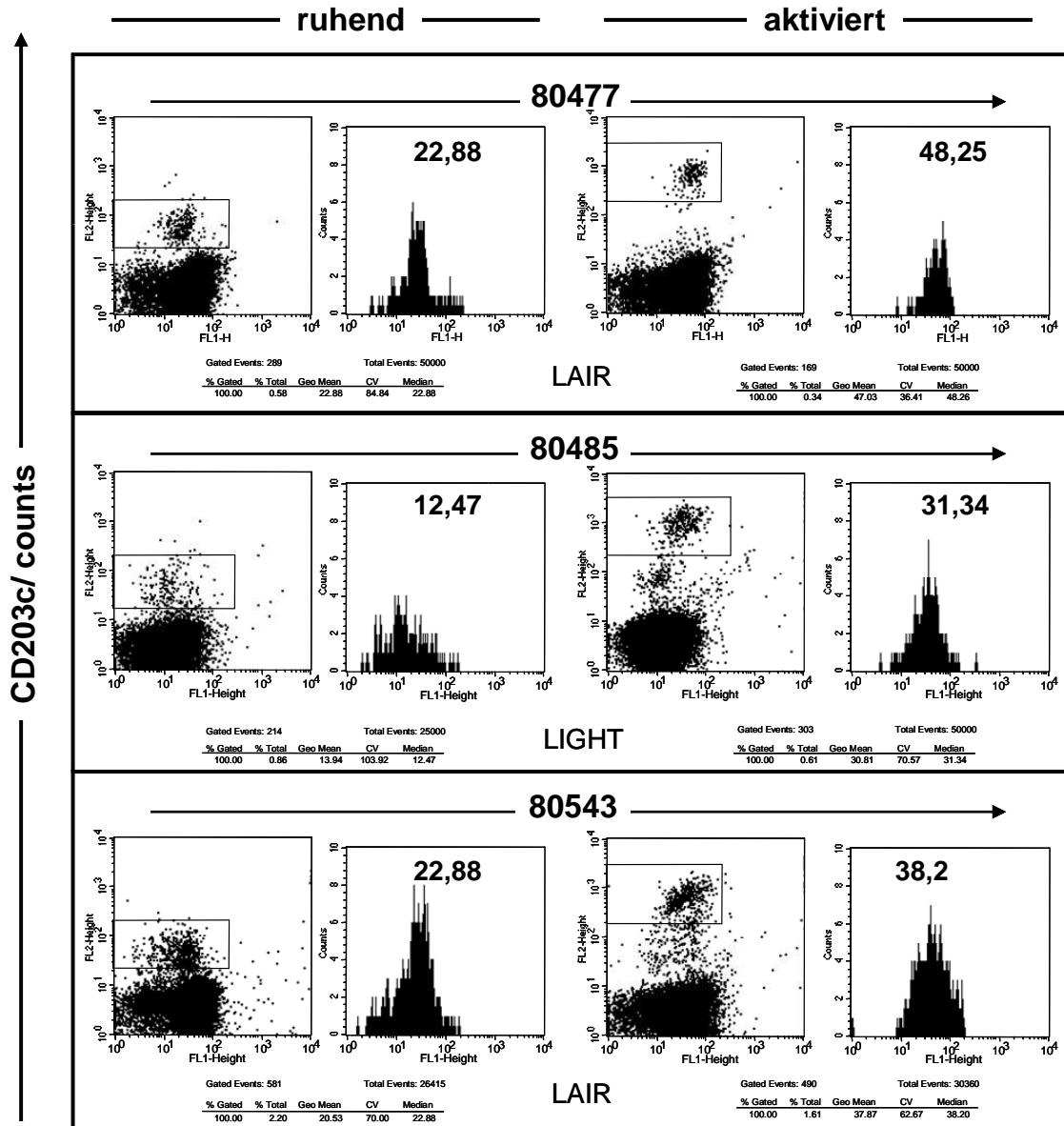
<b>3. Sektion NK- Zellen</b>			
<b>HLDA- Antikörper- Nummer</b>	<b>Antigenspezifizierung</b>	<b>MFI auf ruhenden Basophilen</b>	<b>MFI auf aktivierten Basophilen</b>
80174	CD56	5,52	2,76
80175	CD56	6,79	4,18
80176	CD56	6,67	2,78
80255	CD16	4,96	3,79
80263	CD56	4,29	3,89
<b>80279</b>	<b>auf T- und NK- Zellen</b>	<b>92,22</b>	<b>154,69</b>
<b>80281</b>	<b>CD244</b>	<b>42,94</b>	<b>21,87</b>
80290	KIR2D- Epitop	7,04	4,22
80335	CD56	3,02	4,29
80340	NK CLA (NK cell like antigen)	12,19	4,91
80390	NKG2D	7,64	12,13
<b>80427</b>	<b>NK- T</b>	<b>10,94</b>	<b>15,82</b>
80432	NKG2D	12,63	5,42
80442	NKp46	14,52	4,61
80452	CRACC	8,98	5,28
80475	LAIR	39,6	43,71
<b>80476</b>	<b>LAIR</b>	<b>27,63</b>	<b>22,67</b>
<b>80477</b>	<b>LAIR</b>	<b>22,07</b>	<b>50,48</b>
80525	NKP30	5,09	5,28
80527	NKP46	4,78	7,43
80528	NKG2D	5,33	7,04
<b>80543</b>	<b>LAIR-1</b>	<b>22,88</b>	<b>38,2</b>
80544	NKp30	3,25	7,1
80545	NKp30	4,03	2,46
80546	NKp46	5,33	2,5
80547	NKp46, nicht spezifisch	4,87	2,62
80548	NKp46	5,52	8,28
80549	CD94	9,82	4,57
80550	CD94	8,13	4,7
80551	CD158b1/b2/j	5,62	4,91











**Abbildung 9** Ausgewählte positiv getestete Workshopantikörper

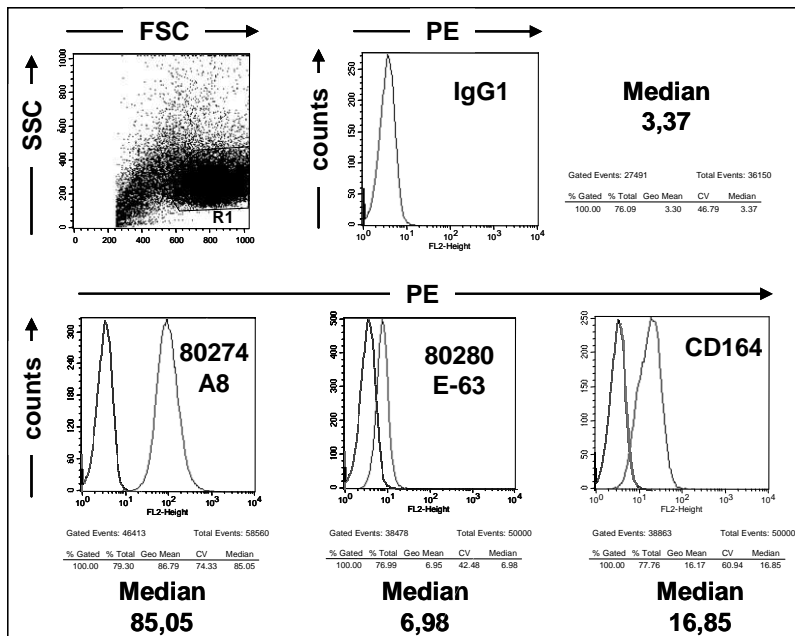
Es sind jeweils die Dot-Plots und die dazugehörigen Histogramme für ruhende (linke Seite) und aktivierte Basophile (rechte Seite) gezeigt. In den Histogrammen sind die Werte der medianen Fluoreszenzintensität angegeben. Oberhalb der Plots ist die Antikörpernummer des Workshops, unterhalb die Information über das entsprechende Antigen angegeben.

## **3.2 Identifizierung neuer Aktivierungsmarker**

Durch das Screening der Workshopantikörper konnten drei neue Aktivierungsmarker identifiziert werden: 1. CD164 (Antikörper 80160 und 80162) mit einem SI von 10- 22; 2. Antikörper Nummer 80274 mit einem Stimulationsindex (SI) von 3- 6; 3. Antikörper Nummer 80280 mit einem SI von bis zu 120. Weitere Antigene sind möglicherweise schwache Aktivierungsmarker, wie zum Beispiel Antikörper 80455 (OX108) mit einem SI von 2. Ein uneinheitliches Bild ergab sich für die verschiedenen Antikörper gegen LAIR und Light. Auch wiederholte Messungen erbrachten kein eindeutiges Ergebnis. Möglicherweise handelt es sich um schwache Aktivierungsantigene.

### **3.2.1 Expression der neuen Aktivierungsmarker auf KU812-Zellen**

Zur Identifizierung der Antigene von Antikörper 80274 (A8) und 80280 wurde eine geeignete Zelllinie gesucht. KU812-Zellen, eine basophile Leukämiezelllinie, zeigten in der indirekten Fluoreszenzmarkierung mit einem PE-Konjugat eine starke Expression des 80274-Antigens (Median: 85,05; siehe Abb. 10). 80280 zeigte nur eine sehr schwache Reaktivität, die sich kaum signifikant von der Kontrolle unterschied (Median: 6,98; siehe Abb. 10). Da dieses Antigen allerdings auch auf ruhenden Basophilen offenbar ausschließlich intrazellulär lokalisiert ist, wurden die KU812-Zellen trotzdem ausgewählt. Die direkte Markierung mit einem CD164-PE Konjugat zeigte für dieses Antigen eine schwache Reaktivität (Median: 16,85; siehe Abb. 10).

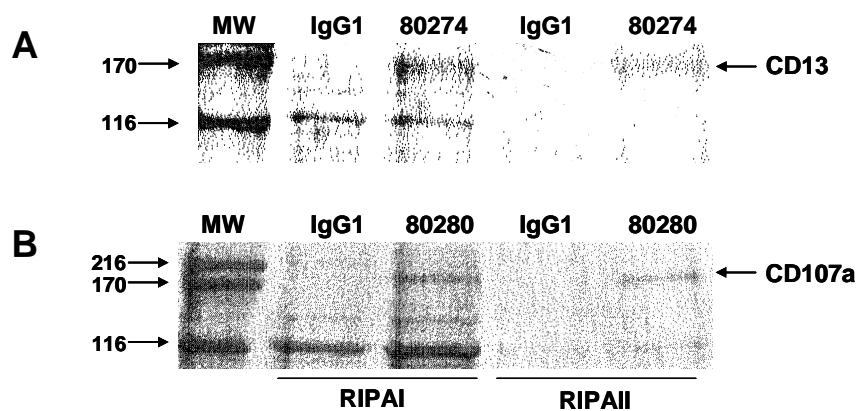


**Abbildung 10 Expression der neuen Aktivierungsmarker auf KU812-Zellen**  
 KU812-Zellen wurden indirekt mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper für die unbekanntenen Antigene A8 und E-63 markiert. Für CD164 wurde ein PE-Direktkonjugat verwendet. Als Kontrolle wurde unspezifisches IgG1 verwendet.

### 3.2.2 Identifizierung der Spezifität von Antikörper 80274 und 80280

Zur Immunpräzipitation des Antigens wurden ca.  $2 \cdot 10^8$  KU812-Zellen jeweils in RIPA I und RIPA II Lysepuffer lysiert (siehe 2.1 und 2.3.1). RIPA I wurde als milder Lysepuffer mit wenig Detergenzien (NP40 substitute, Deoxycholat) gewählt, um die Effizienz der Antikörper- Antigen Interaktion möglichst wenig zu beeinflussen. RIPA II enthält dagegen mehrere, stärkere Detergenzien (Triton X-100, SDS und andere), um vor allem Membranproteine besser in Lösung zu

bringen. Die Proben wurden auf einem 10% Laemmli-Gel separiert (siehe 2.3.3). Banden, die spezifisch mit den Antikörpern präzipitierten (siehe Abb. 11), wurden ausgeschnitten und mit einer NanoHPLC-ESI-MS/MS Analyse identifiziert. Dafür wurden die mit RIPA II erhaltenen Banden verwendet, da hier insgesamt weniger unspezifische Banden präzipitiert wurden. Die Analyse wurde freundlicher Weise durch die Arbeitsgruppe von Professor A. Nordheim am Tübinger Proteomcenter durchgeführt (siehe 2.4). Die Analyse erbrachte für Antikörper 80274 (A8) als wahrscheinliches Antigen CD13 und für 80280 (E-63) CD107a. Die Spezifität des Antikörpers 80274 für CD13 wurde von Dr. Stockinger in Wien, die von 80280 für CD107a von Dr. Meikle in Adelaide durch Messung auf entsprechenden Transfektanten bestätigt.



**Abbildung 11 Spezifisch mit Antikörper 80274 (A8) und 80280 (E-63) präzipitierte Banden**

Gezeigt ist das Coomassie- gefärbte SDS-Gel der spezifisch mit **A:** Antikörper 80274/A8 und **B:** Antikörper 80280/E-63 präzipitierten Banden. In der ersten Reihe ist der Größenmarker (MW) aufgetragen; die Größe der Banden ist in kiloDalton angegeben. Die zweite und dritte Reihe enthalten jeweils die Präzipitate von Kontrolle und Reaktion der mit RIPA I hergestellten Lysate. Reihe vier und fünf enthalten die Präzipitate der mit RIPA II lysierten Zellen.

### **3.3 CD164 als Aktivierungsmarker auf Basophilen**

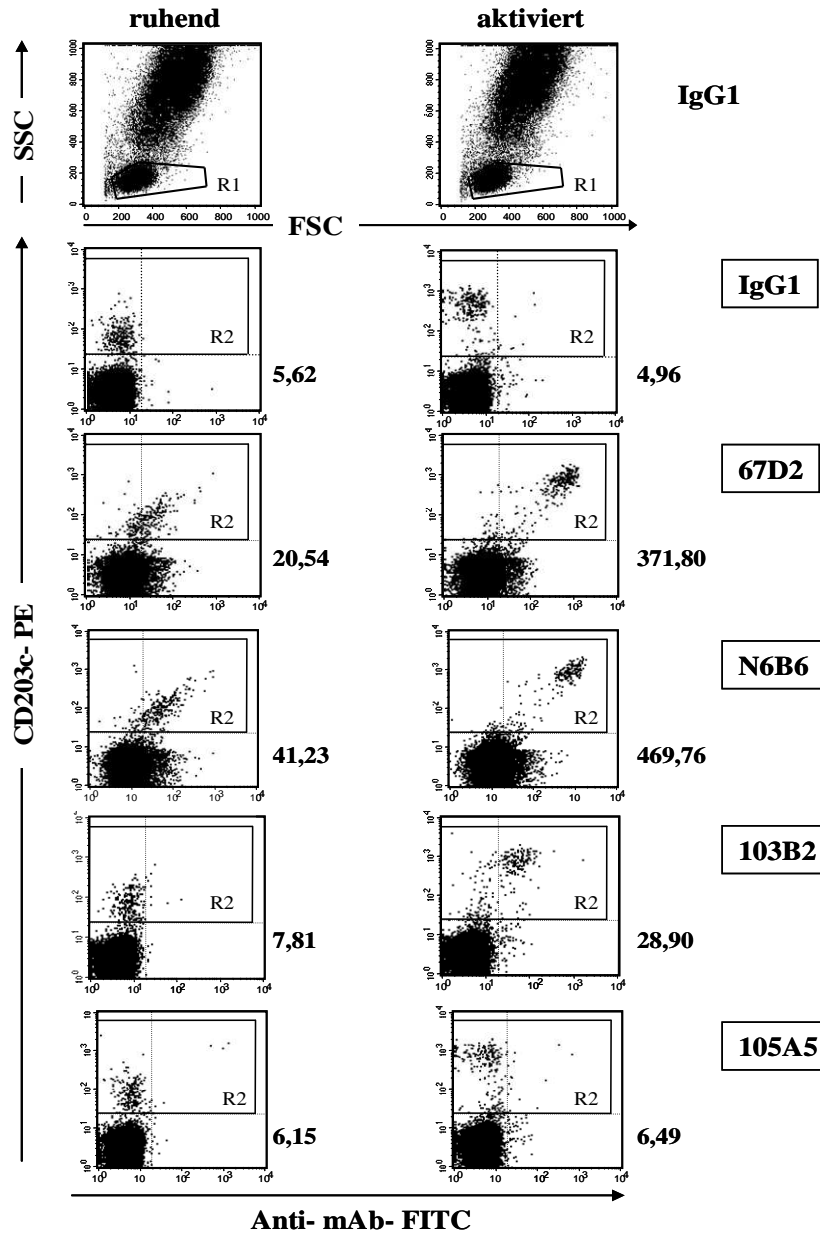
#### **3.3.1 Reaktivität verschiedener CD164 Antikörper mit Basophilen**

Für CD164 standen insgesamt vier monoklonale Antikörper zur Verfügung. Ihre Reaktivität mit unterschiedlichen Geweben ist sehr verschieden und hängt stark von der Glykosylierung des Moleküls ab. Dadurch lassen sich drei Klassen von Epitopen unterscheiden: Klasse I umfasst gegen Sialidase sensitive, Klasse II gegen N-Glycosidase sensitive und Klasse III gegen Glycosidase resistente Epitope [47, 114, 123]. Bei der vergleichenden Messung dieser Epitope mit spezifischen monoklonalen Antikörpern auf ruhenden und aktivierten Basophilen zeigte sich eine deutlich unterschiedliche Reaktivität. Verwendet wurden jeweils 20µl Kulturüberstand. Die Antikörper gegen die Klasse III Epitope N6B6 und 67D2 erkennen CD164 auf Basophilen mit ähnlicher Effizienz. Der Stimulationsindex (SI) für 67D2 betrug 18, bei einer medianen Fluoreszenzintensität (MFI) auf aktivierten Basophilen von 371,80. Der SI für N6B6 betrug 11, bei einer entsprechenden MFI von 469,76. Das Klasse II Epitop 103B2 zeigt nur auf aktivierten Basophilen eine geringe Reaktivität (Median: 28,90), während das Klasse I Epitop 105A5 gar keine Reaktivität mit Basophilen zeigt. Dies deutet darauf hin, dass CD164 in basophilen Granulozyten in anderer Weise glykosyliert wird wie zum Beispiel in CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen; auf diesen Zellen zeigt sich eine hohe Reaktivität mit 105A5. Die Messungen sind in Abbildung 12 dargestellt.

### **3.3.2 Aktivierungskinetik von CD164**

Zur näheren Charakterisierung wurden Basophile unterschiedlich lang mit 0,5µg anti-IgE stimuliert und auf ihre Reaktivität mit CD164-Antikörper (67D2) untersucht. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator bei 37°C. Der Zeitpunkt  $t_{(0 \text{ Minuten})}$  entstand durch Messung einer unstimulierten Probe. Die längeren Zeitpunkte wurden jeweils zuerst stimuliert, so dass zum Schluss alle Proben gleichzeitig mit 20mM EDTA gestoppt wurden. Die Markierung erfolgte für CD164 indirekt mit einem FITC-konjugierten anti-Mausimmunglobulin Antikörper, die für CD203c direkt mit einem PE-Konjugat (siehe auch 2.2.2).

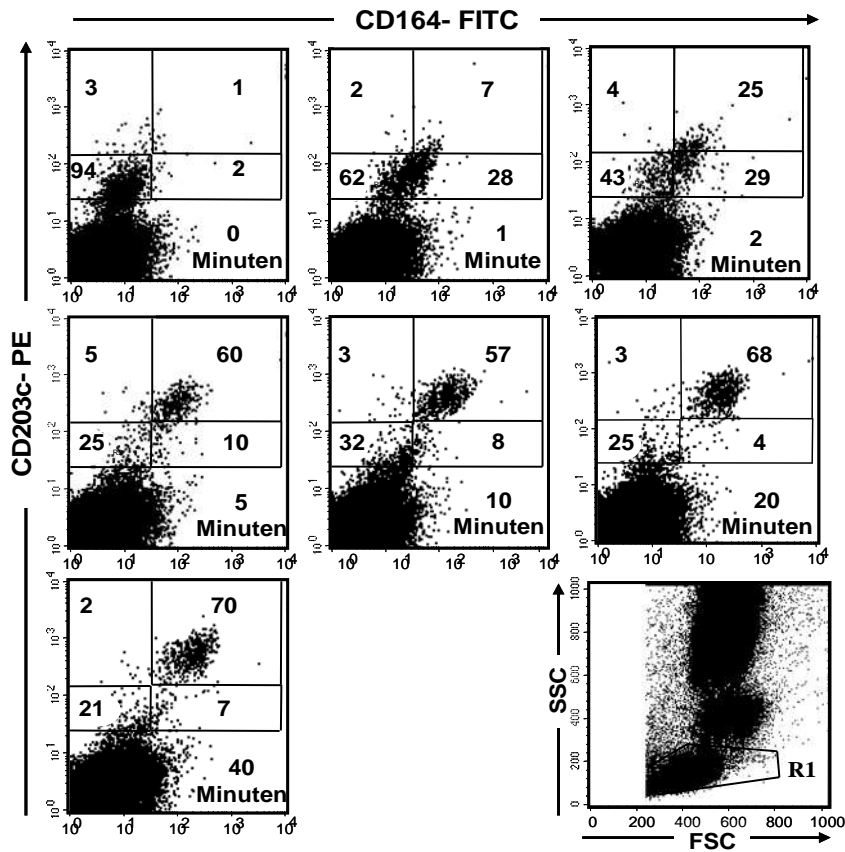
Abbildung 13 zeigt die Aktivierungskinetik der CD164-Hochregulierung. Die Stimulierungszeiten sind in den Plots angegeben. Die für CD203c positiven Zellen sind in vier Quadranten unterteilt, in denen der jeweilige Prozentsatz bezogen auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen angegeben ist. Man erkennt deutlich, dass sich die doppelt positive Population annähernd diagonal verschiebt. Dies lässt auf eine zeitgleiche und ähnlich starke Hochregulierung von CD203c und CD164 schließen.



**Abbildung 12** Reaktivitäten verschiedener CD164 Antikörper

PB Basophile wurden auf die Expression unterschiedlicher CD164 Epitope untersucht. Die Antokörper N6B6 und 67D2 erkennen Klasse III, Antikörper 103B2 Klasse II und Antikörper 105A5 Klasse I Epitope. Ruhende (linke Seite) und Aktivierte Zellen (rechte Seite) wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben gefärbt und analysiert. Neben den Plots sind die Werte der medianen Fluoreszenzintensität innerhalb der CD203c<sup>+</sup>-Population angegeben.





**Abbildung 13 Aktivierungskinetik von CD164 und CD203c**

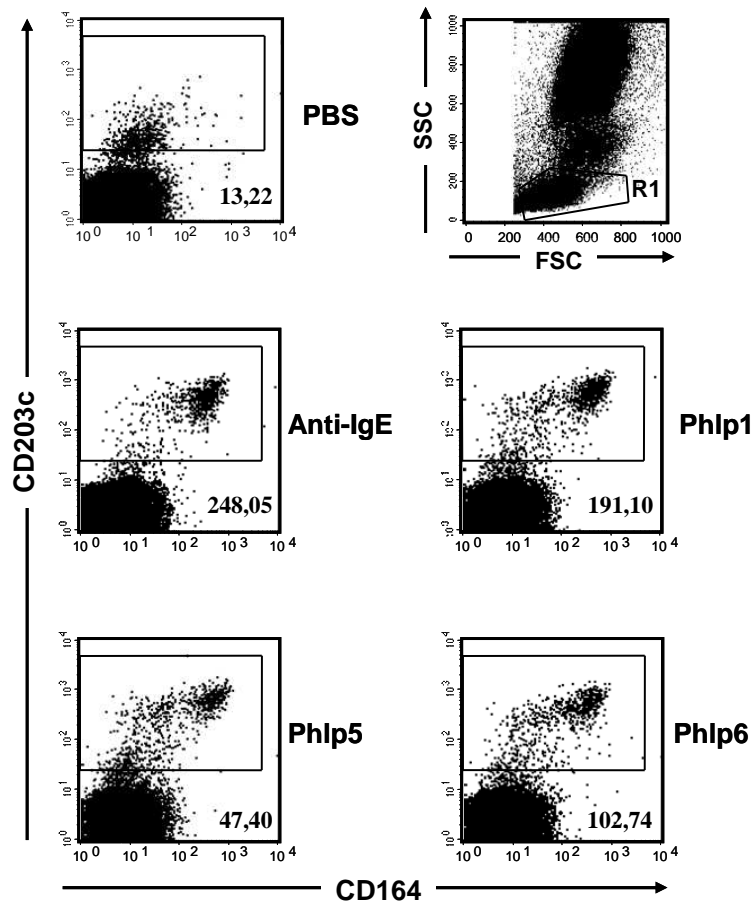
Heparinisierte PB-Zellen wurden unterschiedlich lang mit 0,5µg eines aktivierenden anti-IgE Antikörpers inkubiert. Die Stimulation erfolgte bei 37°C. Die Reaktion wurde mit 20mM EDTA gestoppt. CD203c wurde direkt mit einem PE-Konjugat, CD164 indirekt mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Angegeben sind jeweils die Prozentsätze der verschiedenen Populationen und die Stimulationszeit mit anti-IgE in Minuten.

### 3.3.3 Allergeninduzierte Hochregulierung von CD164 bei einem Lischgrasallergiker

Die Stimulation von Basophilen mit vernetzenden anti-IgE Antikörpern simuliert die allergeninduzierte Aktivierung. Um die Hochregulation von CD164 durch den physiologischen Stimulus eines Allergens zu testen, wurde Blut eines Lischgrasallergikers untersucht. Gesichert war bei diesem Patienten der Universitätshautklinik Tübingen eine Allergie gegen Gräserpollen (Pricktest zweifach positiv, spezifisches IgE positiv). Als Kontrolle wurden Zellen mit PBS, bzw. mit 1µg/ml anti-IgE Antikörper inkubiert. Die Allergene wurden in einer Konzentration von 2µg/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 20 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad. Der Stimulationsindex (SI) von CD164 für die mit anti-IgE stimulierte Probe betrug 18,76. Für Phlp1, Phlp5 und Phlp6 ergaben sich jeweils SI-Werte von 14,48, 3,88 und 7,77. Ein Vergleich mit den Werten für CD203c ist in Tabelle 2 abgebildet. Die Messungen sind in Abbildung 14 dargestellt.

**Tabelle 2 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensitäten und der SI-Werte von CD164 und CD203c nach Allergenstimulation**

	CD164		CD203c	
	MFI	SI	MFI	SI
PBS	13,22	1	40,32	1
anti- IgE	248,05	18,76	557,31	13,82
Phlp1	191,1	14,48	441,31	10,93
Phlp5	47,4	3,88	429,35	10,65
Phlp6	102,74	7,77	445,08	11,04

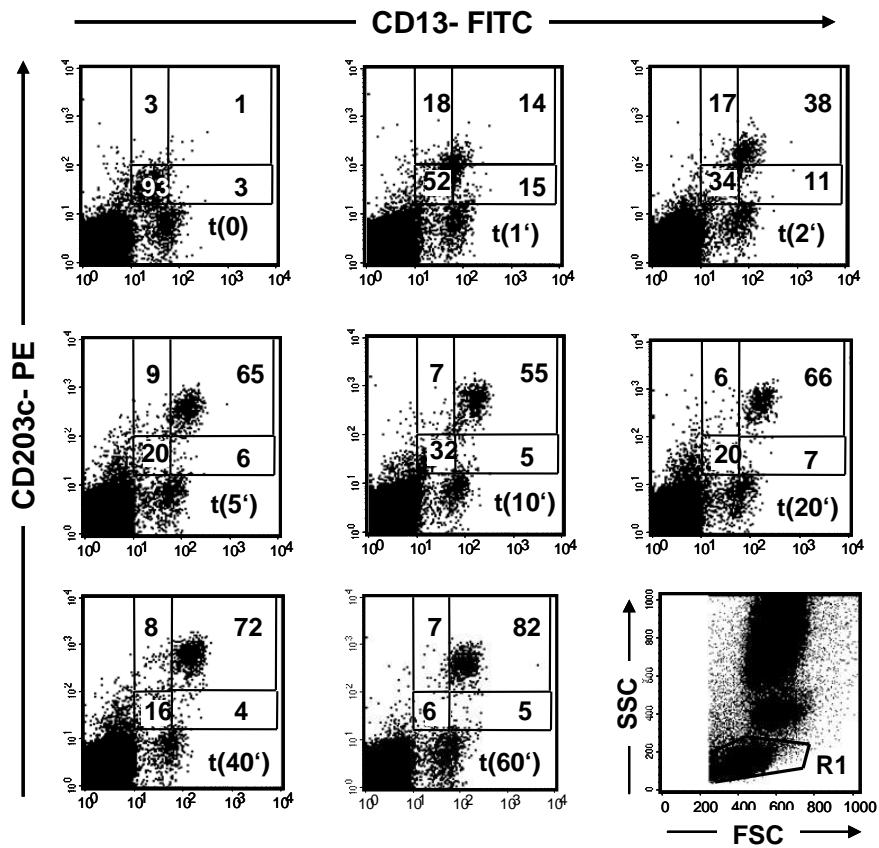


**Abbildung 14 Allergeninduzierte Hochregulierung von CD164**

Heparinisierte PB-Zellen wurden unterschiedlich lang entweder mit 1µg der verschiedenen Lischgrasallergene, mit PBS oder mit 0,5µg eines aktivierenden anti-IgE Antikörpers bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20mM EDTA gestoppt. CD203c wurde direkt mit einem PE-Konjugat, CD164 indirekt mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. In den Plots ist die jeweilige mediane Fluoreszenzintensität für CD164 angegeben.

### **3.4 CD13 als Aktivierungsmarker auf Basophilen**

Ruhende Basophile zeigen auf ihrer Oberfläche eine moderate Expression von CD13 mit einer relativen medianen Fluoreszenzintensität (MFI-Ratio) von 8- 10. Die für CD13 beobachtete Hochregulation nach anti-IgE Stimulation war mit einem Stimulationsindex von 3- 6 am schwächsten unter den hier beschriebenen Aktivierungsmarkern. Die Aktivierungskinetik von CD13 wurde analog wie in Kapitel 3.3.2 für CD164 beschrieben durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem monoklonalen CD13-Antikörper A8 aus dem Workshop, der indirekt mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert wurde. Abbildung 15 zeigt die Plots dieser Untersuchung. Die Stimulierungszeiten sind in den Plots angegeben. Die für CD203c positiven Zellen sind in vier Quadranten unterteilt, in denen der jeweilige Prozentsatz bezogen auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen angegeben ist. Dabei zeigte sich, wie auch bei CD164, eine annähernd parallele Verschiebung der doppelt positiven Population. Das heißt, dass Zellen die CD203c und CD164 hochregulieren auch gleichzeitig CD13 hochregulieren.



**Abbildung 15 Aktivierungskinetik von CD13 (A8)**

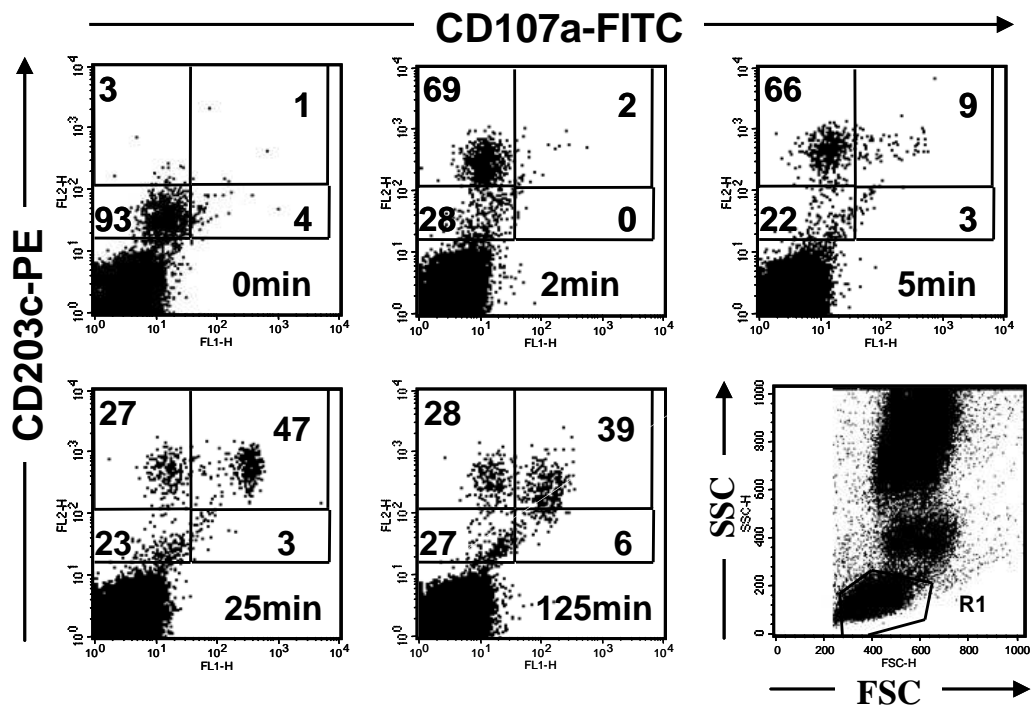
Heparinisierte PB-Zellen wurden unterschiedlich lang mit 0,5µg eines aktivierenden anti-IgE Antikörpers inkubiert. Die Stimulation erfolgte bei 37°C. Die Reaktion wurde mit 20mM EDTA gestoppt. CD203c wurde direkt mit einem PE-Konjugat, CD13 indirekt mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Angegeben sind jeweils die Prozentsätze der verschiedenen Populationen und die Stimulationszeit mit anti-IgE in Minuten.

### **3.5 CD107a und CD107b als Aktivierungsmarker auf Basophilen**

CD107a und CD107b (LAMP1/2) sind ubiquitär exprimierte Proteine lysosomaler Membranen. Antikörper zeigen auf ruhenden Basophilen keine, bzw. nur eine sehr schwache Reaktivität. Auch andere Zellen des peripheren Bluts zeigen keine signifikante Oberflächenexpression. Im Gegensatz dazu lässt sich nach anti-IgE Aktivierung für CD107a eine MFI-Ratio von über 100 messen. Diese hohen Werte wurden aber nur mit dem neuen monoklonalen Antikörper E63-880 aus dem Workshop beobachtet. Ein FITC-Konjugat der Firma Becton-Dickinson ergab eine schwächere Hochregulierung (MFI-Ratio 30- 40). Möglicherweise hat der neue Antikörper eine höhere Avidität für CD107a. Zur Messung von CD107b stand ebenfalls ein FITC-Konjugat von Becton-Dickinson zur Verfügung. Es zeigte sich eine schwache Hochregulierung mit einem SI von 2- 3.

Die Aktivierungskinetik von CD107a wurde analog wie in Kapitel 3.3.2 für CD164 beschrieben durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem FITC-konjugierten Antikörper von Becton-Dickinson. Abbildung 16 zeigt die Plots dieser Untersuchung. Die Stimulierungszeiten sind in den Plots angegeben. Die für CD203c positiven Zellen sind in vier Quadranten unterteilt, in denen der jeweilige Prozentsatz bezogen auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen angegeben ist. Dabei zeigte sich im Vergleich zu CD203c eine verzögerte Hochregulierung von CD107a. Bemerkenswerterweise kam es nur bei einem Teil der Zellen zu einer starken Hochregulierung, so dass zwei Populationen entstanden. Basophile zwischen diesen beiden Populationen, also Zellen mit einer intermediären Expression von CD107a, wurden praktisch nicht beobachtet. Das heißt, dass CD107a erstens langsamer hochreguliert wird als CD203c, CD164 und CD13. Zweitens scheint, im Gegensatz zu der kontinuierlichen Verschiebung in der

CD203c-Gruppe nach Aktivierung, die Hochregulierung einer alles-oder-nichts Regel zu folgen. Dies entspricht dem für CD63 publizierten Profil [19].



**Abbildung 16 Aktivierungskinetik von CD107a**

Heparinisierte PB-Zellen wurden unterschiedlich lang mit 0,5µg eines aktivierenden anti-IgE Antikörpers inkubiert. Die Stimulation erfolgte bei 37°C. Die Reaktion wurde mit 20mM EDTA gestoppt. Die Messung erfolgte für beide Marker direkt mit konjugierten Antikörpern. Angegeben sind jeweils die Prozentsätze der verschiedenen Populationen und die Stimulationszeit mit anti-IgE in Minuten.

## **3.5 Vergleich der verschiedenen Aktivierungsmarker**

### **3.5.1 Vergleich der anti-IgE Aktivierungskinetiken**

Abbildung 17 stellt die kinetischen Daten der verschiedenen Aktivierungsmarker zusammen. Die Messung und Auswertung der Daten erfolgte gemäß der in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Methode. Es wurde jeweils die Zahl der Zellen bestimmt, die nach Aktivierung für den jeweiligen Marker stärker positiv waren. Diese wurde dann durch die Zahl aller CD203c<sup>+</sup> Zellen, also aller Basophilen dividiert und in Prozent berechnet (siehe auch Abbildung 8 B).

Der Vergleich zeigt deutlich, dass es zwei Gruppen von Aktivierungsmarkern gibt. CD164 und CD13 folgen der schnellen Kinetik von CD203c, und zeigen nahezu auf allen Zellen eine vermehrte Expression. CD107a und CD107b dagegen folgen der langsameren Kinetik von CD63. Charakteristischer Weise zeigt auch nur eine Subpopulation von Basophilen eine Hochregulierung dieser Marker.

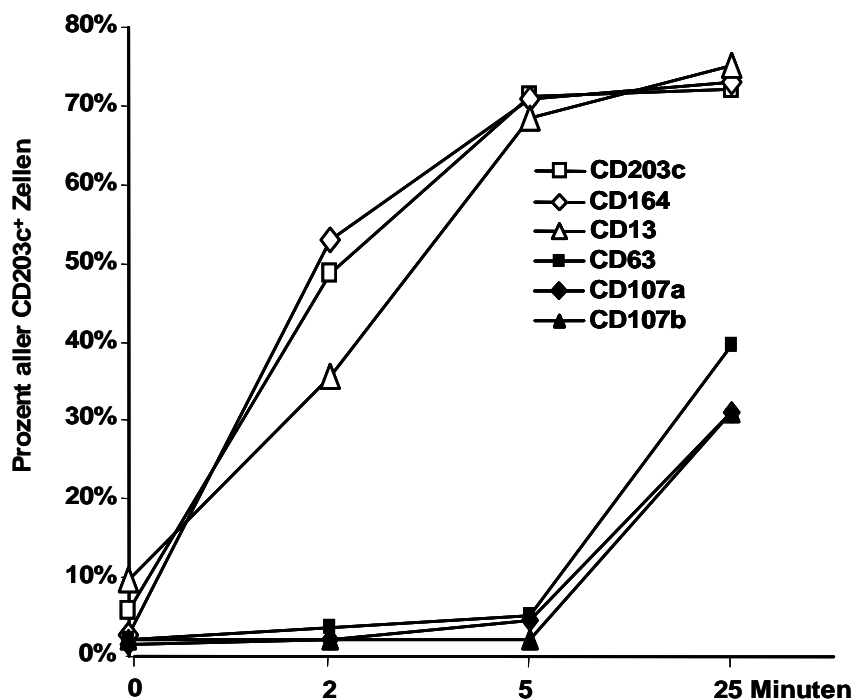
### **3.5.2 Vergleich der TPA Aktivierungskinetiken**

12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) ist ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC). Mit TPA stimulierte Basophile zeigen eine rasche Hochregulierung von CD203c. Eine deutlich vermehrte Oberflächenexpression von CD63 wird dabei allerdings erst nach 40- 60 Minuten beobachtet [19].

Um die Einteilung der neuen Aktivierungsmarker in eine CD203c-Gruppe und eine CD63-Gruppe zu präzisieren, wurde eine vergleichende Kinetik dieser Marker nach TPA-Stimulation erstellt. Dazu wurde TPA in einer Endkonzentration von 500nM eingesetzt. Die Stimulation erfolgte bei 37°C in

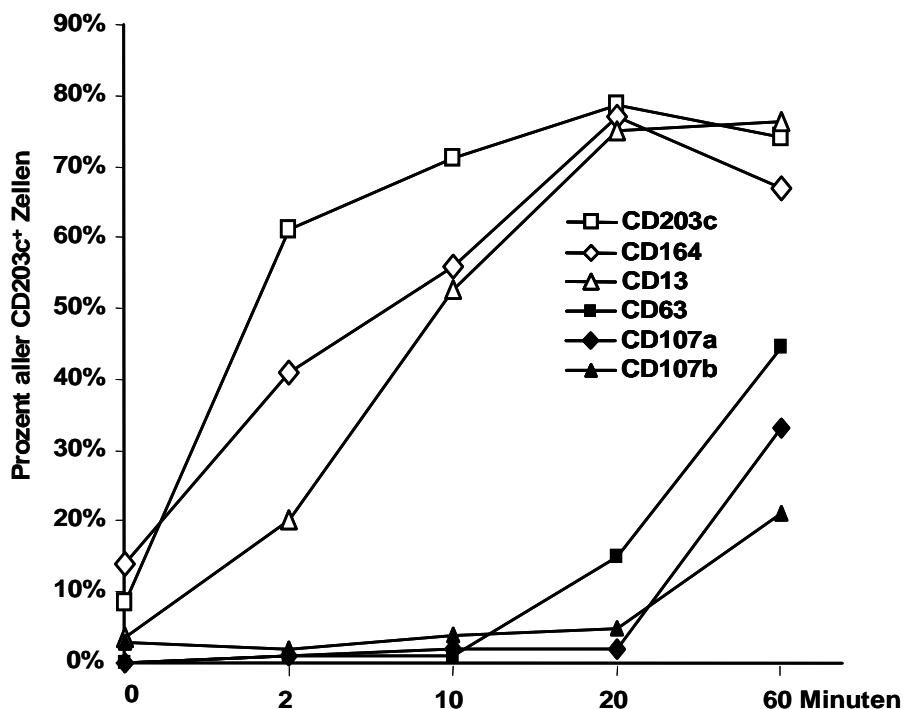


einem Inkubator (siehe auch 2.2.6). Abbildung 18 zeigt die graphische Darstellung dieses Experiments. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass CD164 und CD13 ebenso wie CD203c nach Zugabe von TPA rasch hochreguliert werden. CD107a und CD107b werden hingegen erst verzögert hochreguliert, und folgen damit der Kinetik von CD63.



**Abbildung 17 Vergleich der anti-IgE Aktivierungskinetiken**

Die Grafik zeigt das kinetische Profil der neuen Aktivierungsmarker, sowie das von CD203c und CD63. Angegeben sind die Zellen mit hochregulierter Expression des jeweiligen Markers, bezogen auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen. Dabei wird deutlich, dass CD164 und CD13 parallel mit CD203c hochreguliert wird, und auch ähnliche Werte erreicht. CD107a und CD107b folgen dagegen der Kinetik von CD63, und werden nur von einem Teil der Zellen hochreguliert. Die Daten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 18 Vergleich der TPA Aktivierungskinetiken**

Die Grafik zeigt das kinetische Profil der verschiedenen Aktivierungsmarker nach TPA-Stimulation (500nM). Angegeben sind die Zellen mit hochregulierter Expression des jeweiligen Markers, bezogen auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen. CD164 und CD13 werden sehr rasch und parallel mit CD203c hochreguliert. CD107a und CD107b folgen hingegen der stark verzögerten Kinetik von CD63.

### 3.5.3 Stimulation mit Prostaglandin D2

Die Stimulation von Basophilen mit Prostaglandin D2 (PGD2) zeigt ähnlich wie mit TPA, einen differentiellen Effekt auf die Oberflächenexpression von CD203c und CD63. Während CD203c deutlich hochreguliert wird, zeigt sich keinerlei Veränderung von CD63 [82].

Um den Effekt des Lipidmediators auf die verschiedenen Aktivierungsmarker zu vergleichen, wurde Vollblut mit 10µM PGD2 stimuliert. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad (siehe auch 2.2.6). Anschließend wurde die Probe geteilt und mit den jeweiligen Markern gefärbt. Für CD63 und CD107a/b wurden FITC-konjugierte Antikörper verwendet. Für CD203c ein PE-Konjugat. CD13 und CD164 wurden indirekt mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Wie bereits von Monneret et al. [82] publiziert, zeigte sich eine Hochregulierung von CD203c, nicht aber von CD63. Wie erwartet, wurden CD164 und CD13 ebenfalls hochreguliert, CD107a und CD107b jedoch nicht. Dabei scheint PGD2 allerdings keine stabile Hochregulierung zu erzeugen. Nach 40 und 60 Minuten zeigte sich bereits eine deutliche Abnahme des Effektes.

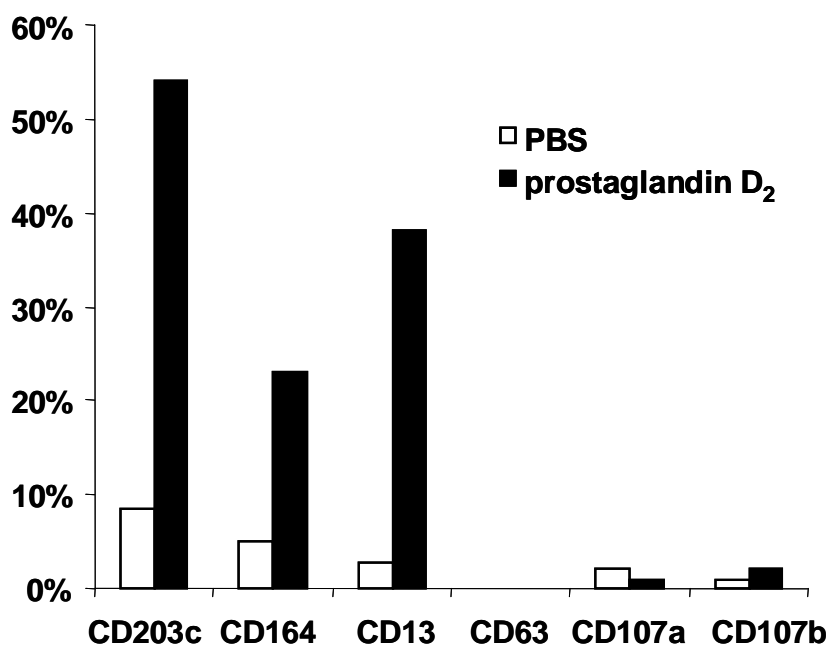
### **3.5.4 Inhibition mit Wortmannin**

Wortmannin ist ein häufig verwendeter Inhibitor der PI3-Kinase. Die Präinkubation mit Wortmannin vor anti-IgE Stimulation, führt zu einer deutlichen Reduktion der Hochregulierung von CD203c und CD63 [19].

Für ein vergleichendes Experiment wurde frisches Vollblut 15 Minuten mit 500nM Wortmannin bei 37°C° in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Basophilen mit 1µg/ml anti-IgE für 20 Minuten stimuliert (siehe auch 2.2.6). Nach dem Stoppen der Reaktion mit 20mM EDTA, wurden die Zellen für die verschiedenen Marker gefärbt. CD13, CD63, sowie CD107a und CD107b wurden direkt mit FITC-konjugierten Antikörpern, CD203c mit einem PE-Konjugat markiert. Für CD164 erfolgte die Färbung mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper. Abbildung 20 zeigt die graphische Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Prozentangaben der für das

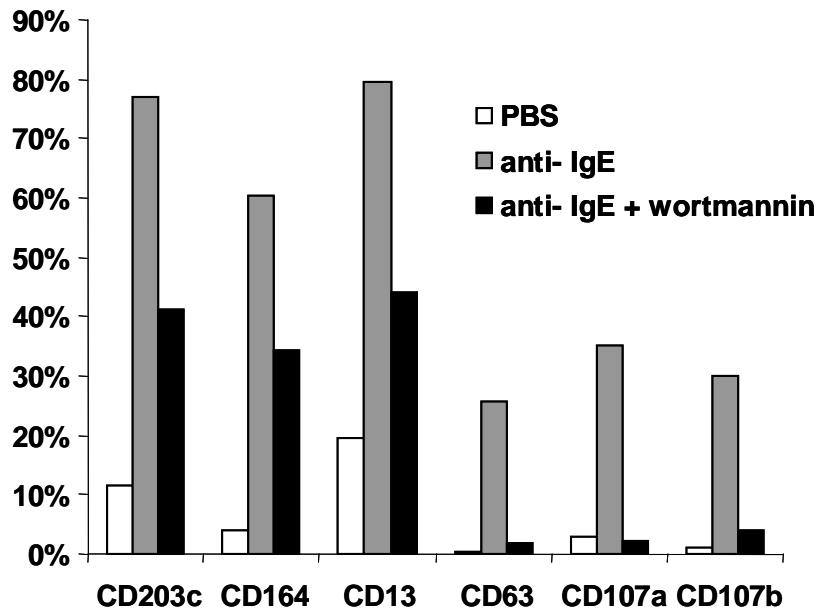
hochregulierte Antigen positiven Basophilen beziehen sich jeweils auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen.

Unter den Bedingungen einer submaximalen Inhibition zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Effektivität gegenüber den verschiedenen Aktivierungsmarkern. Die Hochregulierung von CD203c, CD13 und CD164 wurde im Vergleich zur Kontrolle ohne Wortmannin nur um etwa die Hälfte reduziert. Dagegen wurde die Hochregulierung von CD63, CD107a und CD107b vollständig inhibiert.



**Abbildung 19 Stimulation mit Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)**

Periphere Blutzellen wurden mit 10 $\mu$ M PGD<sub>2</sub> für 10 Minuten stimuliert. Anschließend wurden die Proben geteilt und für die angegebenen Oberflächenmoleküle markiert. Angegeben sind die Zellen mit hochregulierter Expression des jeweiligen Markers, bezogen auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen. Für CD203c, CD164 und CD13 sieht man eine deutliche Hochregulierung, während PGD<sub>2</sub> keinen Effekt auf CD63 oder CD107a/b hat.



### Abbildung 20 Inhibition mit Wortmannin

Frisches Vollblut wurde 15 Minuten mit 500nM Wortmannin vor anti-IgE Aktivierung (1µg/ml) präinkubiert. Nach der 20minütigen Stimulation wurden die Zellen für die verschiedenen Marker gefärbt. Angegeben sind die Zellen mit hochregulierter Expression des jeweiligen Markers, bezogen auf alle CD203c<sup>+</sup> Zellen. Die Abbildung zeigt, dass bei dieser Konzentration des Inhibitors die Hochregulierung von CD203c, CD13 und CD164 nur teilweise reduziert wird. Die Hochregulierung von CD63 und CD107a/b wird dagegen vollständig inhibiert.

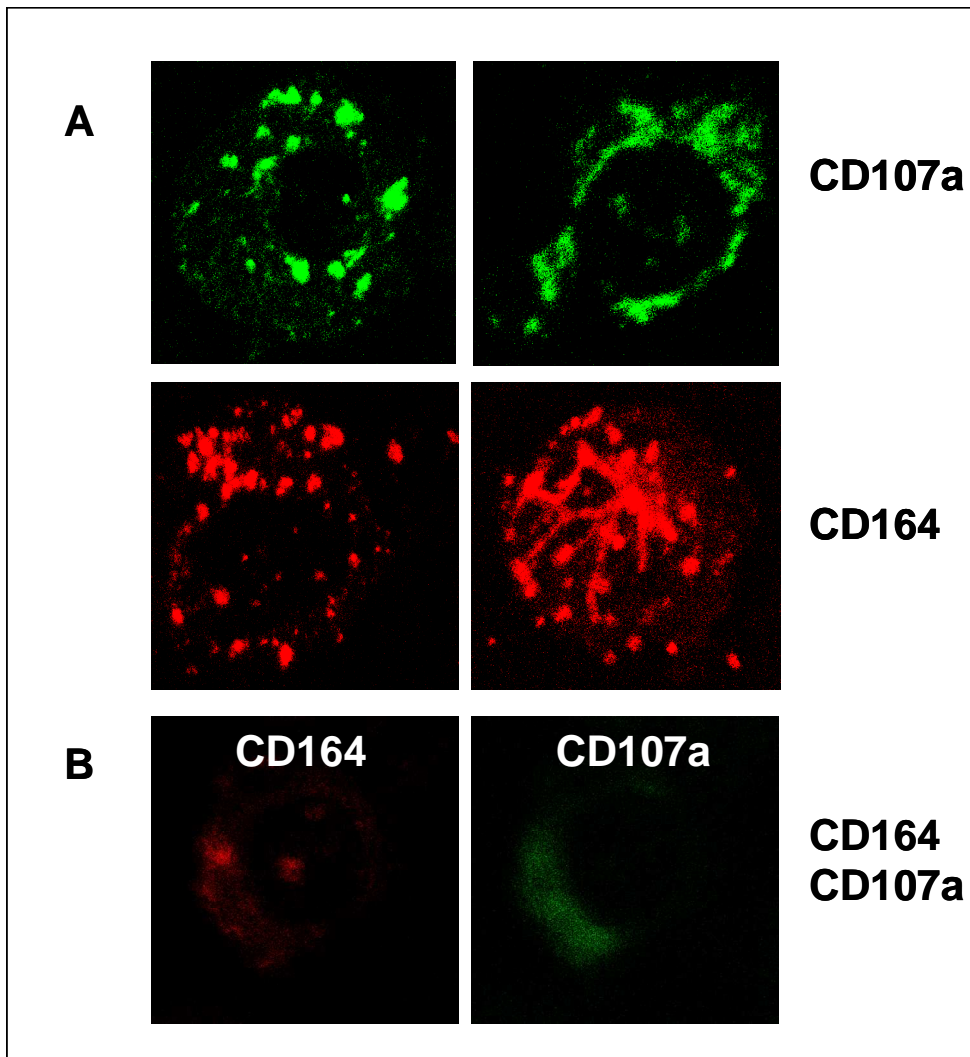
### **3.6.5 Konfokale Lasermikroskopie**

Der Vergleich der verschiedenen Aktivierungsmarker hinsichtlich ihrer Kinetik und ihres Verhaltens auf Stimulatoren und Inhibitoren legt die Existenz zweier Gruppen von Aktivierungsmarkern nahe. Diese unterscheiden sich offenbar in ihren intrazellulären Regulationsmechanismen. Eine nahe liegende Vermutung ist, dass sie sich ebenfalls durch ihre intrazelluläre Lokalisation unterscheiden. Eine etablierte Methode zur Darstellung der Verteilung von Antigenen in subzellulären Kompartimenten ist die konfokale Lasermikroskopie. Insbesondere die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzstoffe ermöglicht den direkten Vergleich verschiedener Marker in einer Zelle.

Die Aufreinigung von Basophilen, insbesondere in größeren Mengen, ist ein aufwendiges Verfahren. Deshalb wurde die basophile Leukämiezelllinie KU-812 verwendet. Um die in Suspension wachsenden Zellen auf einem Objektträger zu färben, musste zunächst ein Protokoll erarbeitet werden (Einzelheiten siehe Kapitel 2.5). Es wurden jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen auf einen Objektträger aufgebracht. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte durch Inkubation mit Methanol bei  $-20\text{ C}^\circ$  in einem Schritt. Als Antikörper wurden die PE-Konjugate von CD203c und CD164, sowie die FITC-Konjugate von CD63 und CD107a verwendet. Hierbei erwies sich in der Doppelfärbung die Kombination von FITC und PE als problematisch, da erstens beide Fluorophore durch die gleiche Wellenlänge angeregt werden und zweitens ein sich teilweise überlappendes Spektrum emittieren. Dies machte aussagekräftige Overlayassays zum Vergleich der intrazellulären Lokalisation unmöglich. Weiterhin war das Signal der meisten Konjugate zu schwach, insbesondere das von CD203c. Lediglich mit CD164 konnte ein zuverlässiges Signal in praktisch allen Zellen erzeugt werden. CD107a ergab nur in wenigen Zellen ein deutliches Signal.

Abbildung 21 A zeigt verschiedene Zellen in der Einfachmarkierung für CD107a-FITC und CD164-PE. Man erkennt jeweils ein granuläres Verteilungsmuster. Für CD164 zeigten sich zum Teil auch tubulär erscheinende Strukturen, wie sie in der rechts abgebildeten Zelle in der Einfachmarkierung zu sehen sind. Abbildung 21 B zeigt eine Doppelmarkierung dieser Marker. Es handelt sich jeweils um die gleiche Zelle, die einmal mit einem FITC- und einmal mit einem PE-Filter aufgenommen wurde. Das Signal ist sehr schwach und die Auswertung aus den oben genannten Gründen zurückhaltend zu bewerten. Man erkennt aber, dass sich das Signalmuster von CD164 und CD107a deutlich unterscheidet.

Als wesentliches Ergebnis konnte in diesem Kapitel ein Protokoll für die Immunfluoreszenzmarkierung in Suspension wachsender KU-812 Zellen erarbeitet werden. Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl CD164, als auch CD107a mit granulären Strukturen assoziiert sind. Vermutlich handelt es sich dabei um unterschiedliche Granula, da die beiden Marker anscheinend nicht kolokalisiert sind.



**Abbildung 21** Intrazelluläre Lokalisation von CD164 und CD107a

KU812-Zellen wurden auf einem Objektträger fixiert, permeabilisiert und entweder mit CD164-PE, CD107a-FITC oder mit beiden Konjugaten gleichzeitig gefärbt. **A:** Unterschiedliche Zellen mit einer Einfachmarkierung für CD107a und CD164. Man sieht deutlich das granuläre Verteilungsmuster. **B:** Doppelmarkierung einer Zelle für CD164 und CD107a, jeweils mit einem entsprechenden Filter fotografiert. Man erkennt, dass sich die beiden Signale in ihrer Verteilung deutlich unterscheiden.



## 4 Diskussion

Basophile Granulozyten sind wichtige Effektorzellen allergischer Erkrankungen. Durch die rasche Zunahme der Prävalenz dieser Erkrankungen in den letzten Jahren ist das Verständnis ihrer molekularen Mechanismen von besonderem Interesse. Dabei geht es einerseits um neue Methoden in der Diagnostik, und andererseits um neue Strategien in der Therapie. Hier können neue Erkenntnisse über die Aktivierung von Basophilen hilfreich sein. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Oberflächenexpression verschiedener humaner Leukozytenantigene vor und nach Aktivierung dieser Zellen verglichen.

Von den getesteten 252 monoklonalen Antikörpern aus dem 8. Internationalen Leukozytenworkshop zeigten 44 eine Reaktivität mit basophilen Granulozyten. Dabei konnten 10 Antigene erstmals auf der Oberfläche dieser Zellspezies nachgewiesen werden. Neben 2 Antikörpern mit unbekanntem Antigen (80094 und 80275), zählen hierzu der TLR4 (= toll-like-Rezeptor 4), ein EGF-TM7 Rezeptor (= Familie epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen [61]), der F11-Rezeptor, sowie CD107a, CD244, LAIR, LIGHT und das Rhesus17 Antigen.

Vier dieser Antikörper zeigten auf anti-IgE aktivierten Basophilen eine erhöhte Reaktivität. Dabei handelt es sich um zwei Antikörper gegen CD164 (N6B6/80160 und 67D2/80162) und zwei weitere mit ursprünglich unbekannter Spezifität (E63/80280 und A8/80274). Durch Immunpräzipitation konnten für den Antikörper E63/80280 CD107a und für den Antikörper A8/80274 CD13 als Antigen identifiziert werden. Der Stimulationsindex (SI) von CD164 betrug

10- 22, für CD107a teilweise über 100. Für CD13 lag der SI zwischen 3- 6. Damit könnten diese Moleküle in der Diagnostik allergischer Erkrankungen hilfreich sein. Die Messung von CD164 auf den mit Wiesengrasallergenen stimulierten Basophilen zeigte eine eindeutige Hochregulierung (vgl. Tabelle 2). Der Vergleich der unterschiedlichen Allergene Phlp1, 5 und 6 zeigte für CD203c allerdings zuverlässigere Werte. Dies liegt möglicherweise an der etwas schlechteren Qualität der indirekten Markierung von CD164 mit einem FITC-Konjugat, verglichen mit der direkten Färbung mit einem CD203c-PE Konjugat. Gegen CD164 gibt es neben den beiden Antikörpern aus dem Workshop noch die Antikörper 103B2 und 105A5. Der Vergleich der Reaktivitäten mit Basophilen zeigte, dass das Epitop für N6B6 und 67D2 auf aktivierten Basophilen stark exprimiert ist, das von 103B2 hingegen nur schwach auf aktivierten Basophilen, und das von 105A5 gar nicht (vgl. Abb. 12). Interessanterweise sind die beiden letztgenannten Epitope Glykosylierungen des CD164 Moleküls, die z.B. von hämatopoetischen Stammzellen stark exprimiert werden. Man kann somit schließen, dass CD164 in Basophilen auf andere Weise posttranslational modifiziert, das heißt glykosyliert wird, als z. B. in hämatopoetischen Stammzellen.

Eine vergleichsweise geringe Hochregulation zeigte sich für OX108, mit einem maximalen SI von 2. Es handelt sich um den CD200 Rezeptor (CD200R), dessen Expression auf Mastzellen und Basophilen bereits 2003 beschrieben wurde. Die Autoren dieser Arbeit fanden eine Abnahme der spezifischen mRNA nach Allergenstimulation von Mastzellen [119]. Neben dem CD200R, der ein inhibitorisches Signal überträgt, gibt es weitere Isoformen, die allerdings eine stimulierende Funktion haben. Trotz hoher Sequenzhomologie binden sie nicht CD200. Voehringer et al. konnten ihre Expression in Basophilen von Mäusen mit einer Darmwurminfektion nachweisen. Dabei spielt die Assoziation aktivierender CD200R-Formen mit dem Adapterprotein DAP12 eine wichtige Rolle [113]. Ob die Aktivierung von CD200R einen

antagonistischen Einfluss auf die allergeninduzierte Basophilenaktivierung hat, ist unbekannt. Mit einem rekombinanten CD200 oder einem aktivierenden Antikörper ließe sich dies untersuchen. Auf diese Weise konnten neueste Untersuchungen an Mastzellen zeigen, dass CD200R tatsächlich deren allergeninduzierte Aktivierung hemmt [124]. Dabei kommt es über die in Abbildung 1 unterhalb des FcγRIIB dargestellten Mechanismen zur Inaktivierung der MAP-Kinasen [124]. Die Entwicklung pharmakologischer Liganden für den CD200-Rezeptor stellt somit eine aussichtsreiche Strategie in der Therapie allergischer Erkrankungen dar. Dabei könnte sowohl die durch Mastzellen vermittelte Sofortreaktion, wie auch die durch Basophile unterhaltene LPR (= late-phase-reaction) beeinflusst werden.

Gegen LAIR-1 standen mehrere monoklonale Antikörper zur Verfügung. Die Austestung erbrachte kein einheitliches Ergebnis. Zwar zeigte sich mit allen Antikörpern eine schwache Expression des Moleküls, die in einigen Fällen beobachtete Hochregulierung war aber nicht zuverlässig reproduzierbar. Die Stärke der Oberflächenexpression schien vergleichbar mit der auf nahezu allen Zellen des Lymphozytengates (R1) beobachteten Reaktivität. LAIR-1 (leukocyte associated Ig-like receptor-1) ist ein immunglobulinähnlicher Rezeptor mit inhibitorischer Funktion auf NK-Zellen, T-Zellen und Monozyten und wird von den meisten mononukleären Zellen des peripheren Blutes exprimiert [111]. Auch hämatopoetische Vorläuferzellen exprimieren LAIR. Die Vernetzung der Rezeptormoleküle durch monoklonale Antikörper führt z.B. in zytotoxischen T-Zellen zur Unterdrückung der Immunantwort [79]. Dabei wird das inhibitorische Signal vermutlich durch die Aktivierung von SHP2 (Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase) vermittelt, welches an die beiden ITIMS (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) in der cytoplasmatische Domäne des Moleküls bindet [64, 111]. Die Aktivierung von Tyrosinphosphatasen spielt auch bei der negativen Regulation der Basophilenaktivierung eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 1). Die Bedeutung

der Expression von LAIR-1 auf Basophilen ist unklar. Eine Aktivierung des LAIR-Rezeptorkomplexes mit monoklonalen Antikörpern vor Allergenstimulation könnte Aufschluss darüber geben, ob es sich um einen effektiven Mechanismus zur Inhibition der Basophilenaktivierung handelt. Daraus könnte sich eventuell ein pharmakologischer Ansatzpunkt ergeben. Zurzeit sind allerdings weder ein chemischer, noch ein natürlicher Ligand bekannt.

Ein ähnliches Bild, mit einer nicht sicher reproduzierbaren Hochregulierung, zeigte sich für LIGHT (=homologous to lymphotoxin, inducible expression, competes with herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D for HSV entry mediator (HVEM), expressed on T lymphocytes). Die Expression dieses Moleküls auf T-Zellen führt zu einer Entzündungsreaktion mit Aktivierung von Lymphozyten [97]. Im Einzelnen ist zu diesem Molekül noch wenig bekannt.

Bei zwei Antikörpern, CD62L und BSP1, zeigte sich eine Abnahme der Reaktivität nach Aktivierung der Zellen. Für CD62L ist dies seit langem beschrieben [9]. Für BSP1 konnte es in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Der Mechanismus dieser Verminderung der Oberflächenexpression ist bei beiden Molekülen unbekannt. Es könnte sich einerseits um eine Abstoßung, z.B. durch spezifische Proteasen in der Zellmembran handeln. Das Molekül könnte aber andererseits auch durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden, von wo es dann rasch wieder an die Zellmembran zurückgebracht werden kann. Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass die Oberflächenexpression von BSP1 nach 40- 60 Minuten wieder zunimmt.

Der Vergleich der neuen Aktivierungsmarker CD13, CD164 und CD107a zeigte, dass es für die Stärke der Oberflächenexpression von CD13 und CD164 offenbar ein kontinuierliches Spektrum gibt. Es ließ sich während den ersten 5-10 Minuten der Aktivierung eine gleichmäßige Zunahme der Zahl dieser Moleküle an der Zelloberfläche beobachten. Dies entspricht dem Bild von

CD203c. Bei CD107a hingegen scheint es zwei Populationen zu geben, die einer Art alles-oder-nichts Regel folgen: Die Zellen zeigen entweder keine, oder eine starke Reaktivität für diesen Marker. Damit gleicht CD107a dem Profil von CD63. Darüber hinaus zeigten die Kinetiken der neuen Aktivierungsmarker, dass die Moleküle der CD203c-Gruppe sehr viel rascher hochreguliert werden, als die der CD63-Gruppe (vgl. Abb. 17). Erstere zeigten nach 5 Minuten bereits ein Maximum, während dies bei CD63 und CD107a erst nach 15- 25 Minuten beobachtet wurde. Dieser Unterschied legt die Vermutung nahe, dass es zwei grundsätzlich verschiedene Arten von Vesikeln/ Granula in Basophilen gibt. Für die CD203c-Gruppe müsste man eine Population vieler, kleinerer Vesikel postulieren. Dadurch ließe sich die kontinuierliche Hochregulierung erklären. Die konfokale Lasermikroskopie zeigte, dass CD164 tatsächlich mit einer Vielzahl kleiner Vesikel assoziiert ist. Diese Ergebnisse sind allerdings sehr zurückhaltend zu beurteilen, da das schwache Fluoreszenzsignal der anderen Marker einen sinnvollen Vergleich ihrer subzellulären Lokalisation nicht zuließ (vgl. Kapitel 3.6.5). Für die CD63-Gruppe hingegen müsste man von größeren Vesikeln, vermutlich den Histamingranula ausgehen, was die starke, scheinbar übergangslose Hochregulation erklären würde. Interessant ist hier, dass CD63 und CD107a eine Erkennungssequenz in ihrer zytoplasmatischen Domäne aufweisen, über die sie an den Adapterkomplex AP-3 binden [63, 91]. Die heterotetrameren AP-Komplexe sind entscheidend am intrazellulären Eiweißtransport aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) beteiligt, wobei AP-3 für den direkten Transport zwischen TGN und Lysosomen/Endosomen verantwortlich ist [83]. CD203c hat keine solche Sequenz, und könnte demzufolge eine andere subzelluläre Lokalisation aufweisen. Wenn es sich dabei um solche kleinen, für die frühe Hochregulation von Oberflächenmolekülen verantwortlichen Vesikel handelt, ergäben sich daraus weitere, interessante Fragen. Gibt es mehrere Subtypen, mit einem jeweils charakteristischen Markerprofil, das heißt CD203c-Vesikel, CD164-Vesikel usw., oder nur einen Typ? Eine lasermikroskopische Kollokalisationsanalyse

könnte hierüber Aufschluss geben. Da allerdings in dieser Arbeit unter keinen Bedingungen eine isolierte Hochregulation eines Markers der CD203c-Gruppe beobachtet wurde, legt dies nahe, dass es nur einen Typ von solchen Vesikeln gibt. Eine weitere Frage ist, ob es sich dabei um sekretorische Vesikel handelt und welche Mediatoren/ Enzyme sie ggf. enthalten. Ein Zusammenhang der sich hier aufdrängt, ist der zwischen der CD203c-Gruppe und der Piecemeal-Degranulation, kurz PMD (vgl. Kapitel 1.3.2). Hier werden elektronenmikroskopisch kleine Vesikel beobachtet, die von den großen Granula „knospen“ (engl.: budding), und so zu einer stückweisen Mediatorfreisetzung führen. Ein Zusammenhang zwischen PMD und bestimmten molekularen Markern oder Signaltransduktionsmechanismen ist bisher nicht beschrieben. Da sich die Vesikel hierbei aus den Membranen der Granula bilden, müsste man bei einem direkten Zusammenhang mit den CD203c-Markern annehmen, dass sich diese Moleküle ebenfalls in der Granulamembran befinden. Dies ließe dann bei der anaphylaktischen Degranulation (AND), bei der die Granula mit der Zellmembran verschmelzen, einen weiteren Anstieg der CD203c-Marker erwarten. Tatsächlich wird zum Zeitpunkt der maximalen Hochregulation von CD63 und CD107a aber eher eine beginnende Abnahme dieser Marker beobachtet.

Das unterschiedliche kinetische Verhalten der neuen Aktivierungsmarker deutet auf unterschiedliche intrazelluläre Regulationsmechanismen hin. Bühring et al. fanden nach Stimulation mit dem PKC-Aktivator TPA eine rasche Hochregulierung von CD203c, nicht aber von CD63. Erst nach 40- 60 Minuten zeigt CD63 einen leichten Anstieg. Außerdem ließ sich die Hochregulierung beider Marker dosisabhängig mit dem PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin unterdrücken [19]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Hochregulation sowohl von CD164 wie auch von CD13 ebenfalls mit TPA induzieren lässt. Interessant ist hier, dass sich bei mit TPA stimulierten Basophilen elektronenmikroskopisch eine ausgeprägte PMD nachweisen lässt [24]. Dagegen wurde für CD107a und CD107b zunächst kein Anstieg

beobachtet. Wie für CD63 zeigte sich erst nach 40- 60 Minuten ein leichter Anstieg (vgl. Abb. 18). Bei der Inhibition mit Wortmannin zeigte sich, dass die Marker der CD63-Gruppe deutlich stärker inhibiert wurden, als die Marker der CD203c-Gruppe (vgl. Abb. 20). Dies könnte einerseits bedeuten, dass die Moleküle der CD203c-Gruppe eine geringere Signalintensität durch die PI3-Kinase benötigen. Andererseits könnten von der PI3-Kinase unabhängige Signalkaskaden existieren, die ebenfalls zu einer Hochregulation dieser Marker führen.

Monneret et al. zeigten eine Zunahme der CD203c-Expression nach Stimulation mit Prostaglandin D2 (PGD2), die durch den PGD2-Rezeptor CRTH2 vermittelt wird [82]. Dabei handelt es sich um einen von TH2-Zellen, Eosinophilen und Basophilen exprimierten G-Protein gekoppelten Rezeptor, der über ein inhibitorisches G-Protein (G<sub>ái</sub>) zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumionenkonzentration führt [48]. Der Vergleich der verschiedenen Marker nach PGD2 Stimulation zeigte, dass lediglich CD203c, CD164 und CD13 heraufreguliert werden. Auf die Expression von CD63 und CD107 zeigte sich kein Effekt (vgl. Abb. 19).

Diese Experimente legen nahe, dass dem gemeinsamen kinetischen Profil der beiden Gruppen von Aktivierungsmarkern, ein jeweils gemeinsamer intrazellulärer Regulationsmechanismus zugrunde liegt. Vermutlich gibt es dabei für die CD203c-Gruppe verschiedene Stimuli, wie Allergene, PGD2 und auch IL-3. Die gemeinsame Endstrecke der intrazellulären Signaltransduktion ist hierbei noch unklar. Sowohl Allergene als auch PGD2 führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Mit einem Kalziumionophor ließe sich prüfen, ob die Erhöhung des intrazellulären Kalziums alleine ausreichend ist. Die Kalziumkonzentration zeigt nach anti-IgE Stimulation von Basophilen einen biphasischen Verlauf: Zunächst kommt es zu einer raschen und kurzfristigen Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern. Diesem initialen Peak folgt dann eine länger anhaltende Erhöhung durch einen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum. Chelatoren wie EGTA die das

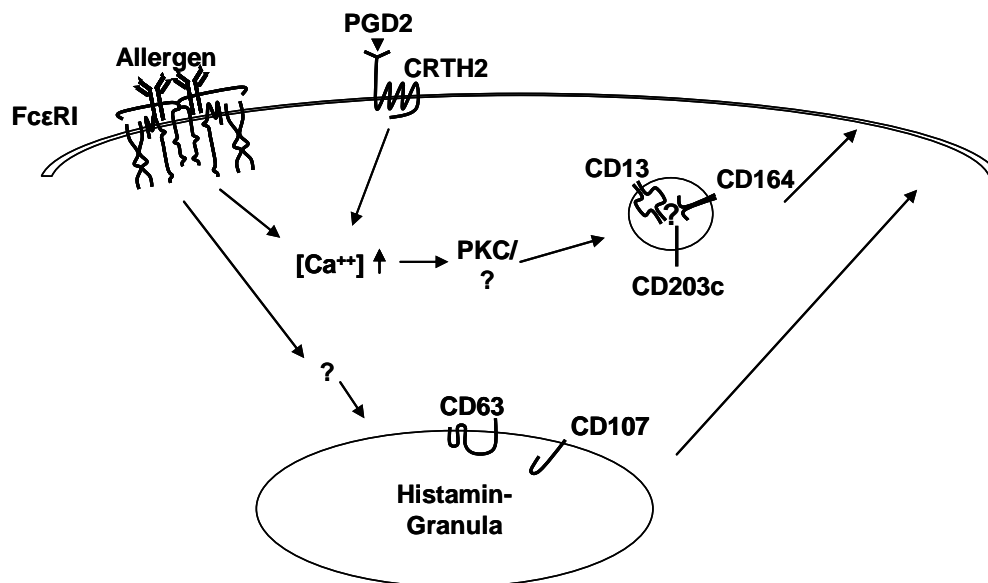
extrazelluläre Kalzium binden verhindern nur diesen zweiten Anstieg und blockieren gleichzeitig die Degranulation [68]. Möglicherweise ist die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher an der Hochregulation der CD203c-Marker beteiligt, während der prolongierte Einstrom extrazellulären Kalziums zur Hochregulation der CD63-Marker beiträgt. Die Anwendung von Kalziumchelatoren in niedrigmolarer Konzentration sollte dann keinen Einfluss auf die CD203c-Marker haben, die Hochregulation der CD63-Marker aber vollständig unterdrücken. Wie durch die Experimente mit TPA gezeigt werden konnte, scheint die Aktivierung der PKC für die Hochregulation dieser Gruppe ausreichend zu sein. Die Aktivität dieses Enzyms ist kalziumabhängig [2]. Eine Aktivierung der PKC in Basophilen durch PGD<sub>2</sub> wurde bisher aber nicht beschrieben. Zu berücksichtigen sind außerdem bei solchen chemischen Aktivatoren, wie auch den Inhibitoren, unspezifische Effekte. Die stark verzögerte Hochregulation von CD63 und CD107 durch TPA könnte auf feedback-Mechanismen zurückzuführen sein. Auch bei dieser Gruppe ist noch unklar, welches die entscheidenden Signaltransduktionswege für ihre Hochregulierung sind.

Über die Bedeutung der enzymatischen Aktivität von CD203c und CD13 kann ebenfalls nur spekuliert werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass nach Abspaltung eines N-terminalen Restes des Chemotaxins MCP-1 (=monocyte chemotactic protein 1), sich die Spezifität der chemotaktischen Wirkung auf Basophile, zugunsten von Eosinophilen ändert [115]. Die enzymatische Aktivität der Aminopeptidase N (CD13) katalysiert eben solche N-terminalen Abspaltungen. Die Hochregulation auf aktivierten Basophilen würde dadurch eine Gewebeeinfiltration mit Eosinophilen fördern. Ob CD13 eine enzymatische Wirkung speziell auf MCP-1 hat ist allerdings unbekannt.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund dieser Arbeit sagen, dass es zwei Gruppen von Aktivierungsmarkern auf Basophilen gibt. Erstens solche, die nach Allergenstimulation eine rasche, kontinuierliche Hochregulation zeigen, die auch



durch PGD2 und TPA induzierbar ist. Zu dieser Gruppe zählen CD203c, CD13 und CD164. Zweitens gibt es solche, die nach Allergenstimulation weniger schnell hochreguliert werden, und dabei zwei Populationen bilden, zwischen denen hinsichtlich der Expressionsstärke kaum Zwischenformen beobachtet werden. Diese Gruppe ist durch PGD2 gar nicht und durch TPA nur stark verzögert induzierbar. Sie wird durch die Moleküle CD63, CD107a und CD107b gebildet. Die im Vorausgehenden diskutierten Möglichkeiten zu den morphologischen und funktionellen Grundlagen dieser beiden Gruppen sind in Abbildung 22 graphisch zusammengefasst. Sie sind rein spekulativ. Ihre weitere Untersuchung könnte zu interessanten Einblicken in die Funktionsweise der basophilen Granulozyten führen.



**Abbildung 22 Hypothetisches Modell zur Regulation der zwei Gruppen von Aktivierungsmarkern**

Sowohl Allergene, als auch PDG2 führen zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums. Dies führt zur Aktivierung von Signalmolekülen (PKC?) und dadurch zur Hochregulation der CD203c-Gruppe. Für die CD63-Gruppe sind zusätzliche Signalmechanismen erforderlich.

# Zusammenfassung

**Einleitung:** Allergische Erkrankungen, vor allem im Kindes und Jugendalter, spielen eine zunehmende Rolle in der klinischen Praxis. Basophile Granulozyten sind dabei wichtige Effektorzellen. Um diese seltenen Zellen näher zu charakterisieren, wurden über 250 monoklonale Leukozytenantikörper, die im Rahmen des 8. HLDA-Workshops (= human leukocyte differentiation antigens) zur Verfügung gestellt wurden, in ihrer Reaktivität mit ruhenden und aktivierten Basophilen verglichen.

**Methoden:** Für das Screening der verschiedenen Antikörper wurden Zellen aus peripherem Vollblut mit Antikörpern stimuliert und mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern über indirekte Fluoreszenzmethoden markiert. Zur Identifizierung der Basophilen wurde ein für Basophile spezifisches CD203c-PE Konjugat verwendet. Nach der Markierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die erhaltenen Daten ausgewertet. Zur Identifikation unbekannter Antigene, wurden Lysate aus KU-812 Zellen mit dem entsprechenden Antikörper über Protein-G Sepharose affinitätsgereinigt und die Antigene immunpräzipitiert. Nach der SDS-Gelseparation wurden die Banden mittels NanoHPLC-ESI-MS durch das Tübinger Proteomcenter analysiert. Zur Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion wurden der Proteinkinase C-Aktivator TPA und der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin verwendet. Ferner wurden die Zellen mit Prostaglandin D2 stimuliert. Für die konfokale Lasermikroskopie von KU-812-Zellen wurden ein CD164-PE Konjugat, sowie ein CD107a-FITC Konjugat benutzt.

**Ergebnisse:** Von den 252 untersuchten monoklonalen Leukozytenantikörpern zeigten 44 eine Reaktivität mit Basophilen. Durch vergleichende Reaktivitätsmessungen von ruhenden und mit anti-IgE aktivierten Basophilen konnten drei neue Aktivierungsmarker identifiziert werden: CD164, und zwei unbekannte Antigene. Letztere konnten als identisch mit CD13 und CD107a identifiziert werden. Die Stimulationsindices betragen für CD164 10-22, für CD13 3-6 und für CD107a teilweise über 100. Der Vergleich der Aktivierungskinetiken dieser Moleküle zeigte für CD164 und CD13 eine rasche Hochregulation analog zu CD203c. CD107a, wie auch CD107b zeigten eine langsamere Kinetik, analog zu CD63. Versuche mit TPA, Wortmannin und Prostaglandin D2 (PGD2) zeigten, dass sich auch hier CD164 und CD13 wie CD203c verhielten, während CD107 sich wie CD63 verhielt. Dabei ist die Aktivierung der PKC durch TPA, sowie die Stimulation mit PGD2 ein effizienter Stimulus für die Hochregulation von Markern der CD203c-Gruppe, nicht aber für die der CD63-Gruppe. Wortmannin zeigt dosisabhängig einen stärkeren Effekt auf die Marker der CD63-Gruppe. Der wesentliche Teil der Ergebnisse wurde in einer internationalen Zeitschrift veröffentlicht [47].

**Diskussion:** In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zwei Gruppen von Basophilen-Aktivierungsmarkern gibt: Solche mit einer zu CD203c analogen Aktivierungskinetik, die nach anti-IgE Stimulation eine rasche und vollständige Hochregulation zeigen. Hierzu zählen neben CD203c die Moleküle CD13 und CD164. Zweitens gibt es solche Marker, die analog zu CD63 reguliert werden und eine etwas langsamere Aktivierungskinetik zeigen. Hierzu zählen neben CD63 die Moleküle CD107a und CD107b. Über den Zusammenhang dieser beiden Gruppen mit morphologischen Veränderungen und Signaltransduktionsmechanismen kann derzeit nur spekuliert werden. Ihre Untersuchung könnte zu einer weiteren Klärung der Funktionsweise der basophilen Granulozyten und zu neuen Strategien in Diagnostik und Therapie allergischer Erkrankungen führen.

# Literaturverzeichnis

- 1 Agis, H., Fureder, W., Bankl, H.C., Kundi, M., Sperr, W.R., Willheim, M., Boltznitulescu, G., Butterfield, J.H., Kishi, K., Lechner, K., Valent, P. (1996)  
Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes  
Immunology, 87(4), 535-543
- 2 Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, JD. (1994)  
The cell  
Garland Publishing, third edition, ISBN 0-8153-1620-8
- 3 Andrejewski, N., Punnonens, EL., Guhde, G., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Figura, K. von, Saftig, P. (1999)  
Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice  
J Biol Chem, 274(18), 12692-12701
- 4 Arock, M., Schneider, E., Boissan, M., Tricottet, V., Dy, M. (2002)  
Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions  
J Leukoc Biol, 71, 557-564
- 5 Bauvois, B. (2004)  
Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis?  
Oncogene, 23(2), 317-329
- 6 Berditchevski, F., Bazzoni, G., Hemler, M.E. (1995)  
Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins  
J Biol Chem, 270 (30), 17784-17790
- 7 Berditchevski, F., Zutter, M.M., Hemler, M.E. (1996)  
Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins)  
Mol Biol Cell, 7 (2), 193-207
- 8 Binder, M., Fierlbeck, G., King, TP., Valent, P., Bühring, HJ. (2002)  
Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients  
Int Arch Allergy Immunol, 129, 160-168

- 9 Bochner, BS. (2000)  
Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences  
J Allergy Clin Immunol, 106(5), 292-302
- 10 Bochner, BS., Schleimer, RP. (2001)  
Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways  
for recruitment  
Immunol Rev, 179, 5-15
- 11 Bochner, BS., Sterbinsky, SA. (1991)  
Altered surface expression of CD11 and Leu8 during human basophil degranulation  
J Immunol, 146(7), 2367-2373
- 12 Bochner, BS., Sterbinsky, SA., Knol, EF., Katz, BJ., Lichtenstein, LM., Mac-  
Glashan, DW. Jr., Schleimer, RP. (1994)  
Function and expression of adhesion molecules on human basophils.  
J Allergy Clin Immunol, 94, 1157-1162
- 13 Bodger, MP., Mounsey, GL., Nelson, J., Fitzgerald, PH. (1987)  
A monoclonal antibody reacting with human basophils  
Blood, 69(5), 1414-1418
- 14 Boumiza, R., Monneret, G., Forissier, MF., Savoye, J., Gutowski, MC., Powell,  
WS., Bienvenu, J. (2003)  
Marked improvement of the basophil activation test by detection CD203c  
Instead of CD63.  
Clin Exp Allergy, 33, 259-265
- 15 Braun, R.K., Foerster, M., Workalemahu, G., Haefner,  
D., Kroegel, C., Walker, C. (2003)  
Differential regulation of aminopeptidase N (CD13) by transendothelial  
migration and cytokines on human eosinophils  
Exp Lung Res, 29(2), 59-77
- 16 Bühring, HJ., Seiffert, M., Bock, TA., Scheduling, S., Thiel, A., Scheffold, A.,  
Kanz, L., Brugger, W. (1999)  
Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells  
Ann N Y Acad Sci, 872, 25-38
- 17 Bühring, HJ., Seiffert, M., Giesert, C., Marxer, A., Kanz, L.,  
Valent, P., Sano, K. (2001)  
The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to  
the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3  
Blood, 97(10), 3303-3305

- 18 Bühring, HJ., Simmons, PJ., Pudney, M., Müller, R., Jarrossay, D., van Agthoven, A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P., Kanz, L. (1999)  
The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors  
*Blood*, 94(7), 2343-2356
- 19 Bühring, HJ., Streble, A., Valent, P. (2004)  
The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis  
*Int Arch Allergy Immunol*, 133, 317-329
- 20 Carlsson, SR., Fukuda, M. (1989)  
Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1  
*J Biol Chem*, 264(34), 20526-20531
- 21 Carlsson, SR., Roth, J., Piller, F., Fukuda, M. (1988)  
Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2  
*J Biol Chem*, 263(35), 18911-18919
- 22 Chan, JY., Lee Prudhoe, J., Jorgensen, B., Ihrke, G., Doyonnas, R., Zannettiono, AC., Buckle, VJ., Ward, CJ., Simmons, PJ., Watt, SM. (2001)  
Relationship between novel isoforms, functionally important domains, and subcellular distribution of CD164/ Endolyn  
*J Biol Chem*, 276, 2139-2152
- 23 Chen, JW., Murphy, TL., Willingham, MC., Pastan, I., August, JT. (1985)  
Identification of two lysosomal membrane glycoproteins  
*J Cell Biol*, 101(1), 85-95
- 24 Crivellato, E., Nico, B., Mallardi, F., Beltrami, CA., Ribatti, D. (2003)  
Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism?  
*Anat Rec*, 274A(1), 778-784
- 25 Dahlgren, C., Carlsson, SR., Karlsson, A., Lundquist, H., Sjölin, C. (1995)  
The lysosomal membrane glycoproteins Lamp-1 and Lamp-2 are present in mobilizable organelles, but are absent from the azurophilic granules of human neutrophils  
*Biochem J*, 211(2), 667-674

- 26 de Paulis, A., Prevete, N., Fiorentino, I., Walls, AF., Curto, M., Petraroli, A., Castaldo, V., Ceppa, P., Fiocca, R., Marone, G. (2004)  
Basophils infiltrate gastric mucosa at sites of Helicobacter pylori infection, and exhibit chemotaxis in response to H. pylori-derived peptide Hp(2-20)  
J Immunol, 172(12), 7734-7743
- 27 Denburg, J.A., Telizyn, S., Messner, H., Lim, B., Jamal, N. Ackermann, S.J., Gleich, G.J., Bienenstock, J. (1985)  
Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor  
Blood, 66(2), 312-318
- 28 Dvorak, AM. (1997)  
A role for visicles in human basophil secretion  
Cell Tissue Res, 293(1), 1-22
- 29 Ehrlich, P. (1878)  
Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung  
Dissertation, Leipzig
- 30 Ehrlich, P. (1879)  
Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen  
Arch Anat Physiol, 1879, 166-169
- 31 El- Hillal, O., Kurosaki, T., Yamamura, H., Kinet, J.P., Scharenberg, A.M. (1997)  
syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction  
Proc Natl Acad Sci, 94, 1919-1924
- 32 Eskandari, N., Wikcrasinghe, T., Peachell, PT. (2004)  
Effects of phosphodiesterase inhibitors on interleukin-4 and interleukin-13 generation from human basophils  
Br J Pharmacol, 142(8), 1265-1272
- 33 Eskelinen, EL., Schmidt, CK., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., Figura, K. von, Knecht, E., Saftig, P. (2004)  
Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts  
Mol Biol Cell, 15(7), 3132-3145

- 34 Falcone, FH., Haas, H., Gibbs, BF. (2000)  
The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses  
*Blood*, 96(13), 4028-4035
- 35 Febbraio, M., Silverstein, RL. (1990)  
Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent  
platelet surface glycoprotein  
*J Biol Chem*, 265(30), 18531-18537
- 36 Field, K.A., Holowka, D., Baird, B. (1997)  
Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor  
within membrane domains  
*J Biol Chem*, 272 (7), 4276-4280
- 37 Fukuda, M. (1991)  
Lysosomal membrane glycoproteins  
*J Biol Chem*, 266(32), 21327-21330
- 38 Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J., Carlsson, SR. (1988)  
Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins,  
h-lamp-1 and h-lamp-2  
*J Biol Chem*, 263(35), 18920-18928
- 39 Fureder, W., Agis, H., Semper, H., Keil, F., Maier, U., Muller, M.R.,  
Czerwenka, K., Hofler, H., Lechner, K., Valent, P. (1995)  
Differential response of human basophils and mast cells to recombinant chemokines  
*Ann Hematol*, 70(5), 251-258
- 40 Fureder, W., Agis, H., Sperr, W.R., Lechner, K., Valent, P. (1994)  
The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils  
*Allergy*, 49(10), 861-865
- 41 Furuta, K., Ikeda, M., Nakayama, Y., Nakamura, K., Tanaka, M., Hamasaki, N.,  
Himeno, M., Hamilton, SR., August, JT. (2001)  
Expression of lysosomal-associated membrane proteins in human colorectal  
neoplasms and inflammatory diseases  
*Am J Pathol*, 159(2), 449-455
- 42 Ghannadan, M., Hauswirth, A.W., Scherthaner, G.H., Müller, M.R.,  
Klepetko, W., Schatzl, G., Sperr, W.R., Bühring, H.J., Valent, P. (2002)  
Detection of novel CD antigens on the surface of human  
mast cells and basophils  
*Int Arch Allergy Immunol*, 127, 299-307



- 43 Gibbs, B.F., Plath, K.E., Wolff, H.H., Grabbe, J. (2002)  
Regulation of mediator secretion in human basophils by p38 mitogen-activated protein kinase: phosphorylation is sensitive to the effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and calcium mobilization  
*J Leukoc Biol*, 72 (2), 391-400
- 44 Grutzkau, A., Smorodchenko, A., Lippert, U., Kirchhof, L., Artuc, M., Henz, BM. (2004)  
LAMP-1 and LAMP-2, but not LAMP-3, are reliable markers for activation-induced secretion of human mast cells  
*Cytometry*, 61A (1), 62-68
- 45 Guarnieri, FG., Arterburn, LM., Penno, MB., Cha, Y., August, JT. (1993)  
The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1  
*J Biol Chem*, 268(3), 1941-1946
- 46 Hauswirth, AW., Natter, S., Ghannadan, M., Majlesi, Y., Scherthaner, GH., Sperr, WR., Bühring, HJ., Valenta, R., Valent, P. (2002)  
Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals.  
*J Allergy Clin Immunol*, 110, 102-109
- 47 Hennersdorf, F., Florian, S., Jakob, A., Baumgärtner, K., Sonneck, K., Nordheim, A., Biedermann, T., Valent, P., Bühring, HJ. (2005)  
Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation  
*Cell Res*, 15 (5), 325-335
- 48 Hiroyuki, H., Kazuya, T., Osamu, Y., Kazuyuki, O., Kazumi, K., Yasushi, T., Michiko, I., Kazuo, S., Masataka, N., Shoichi, T., Kinya, N. (2001)  
Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2  
*J Exp Med*, 193 (2), 255–261
- 49 Ihrke, G., Gray, SR., Luzio, JP. (2000)  
Endolyn is a mucin-like type I membrane protein targeted to lysosomes by its cytoplasmic tail  
*Biochem J*, 345, 287-296

- 50 Iikura, M., Ebisawa, M., Yamaguchi, M., Tachimoto, H., Ohta, K., Yamamoto, K., Hirai, K. (2004)  
Transendothelial migration of human basophils  
*J Immunol*, 173(8), 5189-5195
- 51 Ikeda, N., Nakajima, Y., Tokuhara, T., Hattori, N., Sho, M., Kanehiro, H. Miyake, M. (2003)  
Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma  
*Clin Cancer Res*, 9 (4), 1503-1508
- 52 Jouvin, M.E., Adamczewski, M., Numerof, R., Letourneur, O., Valle, A., Kinet, J.P. (1994)  
Differential control of the tyrosine kinases lyn and syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor  
*J Biol Chem*, 269 (8), 5918-5925
- 53 Juncueira, L.C., Carneiro, J., übersetzt von durch Schiebler, T.H. (1996)  
Histologie  
Springer Verlag, ISBN 3-540-60404-9
- 54 Kannan, K., Stewart, RM., Bounds, W., Carlsson, SR., Fukuda, M., Betzing, ., Holcombe, RF. (1996)  
Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium  
*Cell Immunol*, 171(1), 10-19
- 55 Kawakami, T., Galli, SJ. (2002)  
Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE  
*Nat Rev Immunol*, 2(10), 773-86
- 56 Kay, AB. (2001)  
Allergy and allergic diseases  
*N Engl J Med*, 344(1), 30-36
- 57 Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E., Siraganian, R.P. (1996)  
Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosin-based activation motif peptides  
*Mol Cell Biol*, 16(4), 1471-1478

- 58 Knol, EF., Mul, FP., Jansen, H., Calafat, J., Roos, D. (1991)  
Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435  
*J Allergy Clin Immunol*, 88 (3 Pt 1), 328-338
- 59 Knol, EF., Mul, FP., Lie, WJ., Verhoeven, AJ., Roos, D. (1996)  
The role of basophils in allergic disease  
*Eur Respir J*, Suppl 22, 126-131
- 60 Kurosawa, N., Kanemitsu, Y., Matsui, T., Shimada, K.,  
Ishihama, H., Muramatsu, T. (1999)  
Genomic analysis of a murine cell-surface sialomucin, MGC-24/CD164  
*Eur J Biochem*, 265, 466-472
- 61 Kwakkenbos, MJ., Kop, EN., Stacey, M., Matmati, M., Gordon, S.,  
Lin, H., Hamann, J. (2003)  
The EGF-TM7 family: a postgenomic view  
*Immunogenetics*, 55, 655-666
- 62 Larsen, S.L., Pedersen, L.O., Buus, S., Stryhn, A. (1996)  
T cell response affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming  
of major histocompatibility complex class II-bound peptides  
*J Exp Med*, 184(5), 2073
- 63 Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U., Hoflack, B. (1998)  
The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular  
transport of lysosomal membrane glycoproteins  
*J Biol Chem*, 273(45), 29451-29461
- 64 Lebbink, RJ., de Ruiter, T., Verbrugge, A., Bril, WS., Meyaard, L. (2004)  
The mouse homologue of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1  
is an inhibitory receptor that recruits Src homology region 2-containing  
protein tyrosine phosphatase (SHP)-2, but not SHP-1  
*J Immunol*, 172(9), 5535-5543
- 65 Lee, YN., Kang, JS., Krauss, RS. (2001)  
Identification of a role for the sialomucin CD164 in myogenic differentiation  
by signal trapping in yeast  
*Mol Cell Biol*, 21(22), 7696-7706
- 66 Lindmark, IM., Karlsson, A., Serrander, L., Francois, P., Lew, D.,  
Rasmusson, B., Stendhal, O., Nusse, O. (2002)  
Synaptogamin II could confer Ca<sup>2+</sup> sensitivity to phagocytosis in  
human neutrophils  
*Biochim Biophys Acta*, 1590(1-3), 159-166

- 67 Lohn, M., Mueller, C., Langner, J. (2002)  
Cell cycle retardation in monocytoid cells induced  
by aminopeptidase N (CD13)  
Leuk Lymphoma, 43(2), 407-413
- 68 MacGlashan, D. Jr, Botana, LM. (1993)  
Biphasic Ca<sup>2+</sup> responses in human basophils. Evidence that  
the initial transient elevation associated with the mobilization  
of intracellular calcium is an insufficient signal for degranulation  
J Immunol, 150(3), 980-991
- 69 Maecker, H.T., Todd, S.C., Levy, S. (1997)  
The tetraspanin superfamily: molecular facilitators  
FASEB J, 11 (6), 428-442
- 70 Majlesi, Y., Samorapoompichit, P., Hauswirth, AW., Scherthaner, GH.,  
Ghannadan, M., Baghestanian, M., Rezaie-Majd, A., Valenta, R.,  
Sperr, WR., Bühring, HJ., Valent, P. (2003)  
Cerivastatin and atorvastatin inhibit IL-3-dependent differentiation and  
IgE mediated histamine release in human basophils and downmodulate  
expression of the basophil-activation antigen CD203c/E-NPP3.  
J Leukoc Biol, 73, 107-117
- 71 Marone, G., Genovese, A., Granata, F., Forte, V., Detoraki, A.,  
de Paulis, A., Triggiani, M. (2002)  
Pharmacological modulation of human mast cells and basophils  
Clin Exp Allergy, 32, 1682-1689
- 72 Masuzawa, Y., Mityauchi, T., Hamanoue, M., Ando, S., Yoshida, J.,  
Takao, S., Shimazu, H., Adachi, M., Muramatsu, T. (1992)  
A novel core protein as well as polymorphic epithelial mucin carry peanut  
agglutinin binding sites in human gastric carcinoma cells:  
sequence analysis and examination of gene expression  
J Biochem, 112, 609-615
- 73 Matsui, T., Kurosawa, N., Hibi, K., Akiyama, S., Kasai, Y., Sakamoto, J.,  
Ito, K., Nakao, A., Muramatsu, T. (2000)  
The ratio of splicing variants of MGC-24/CD164, a sialomucin, correlates  
with the metastatic potential of colorectal carcinomas  
J Biochem, 127(6), 1103-1107

- 74 Mattei, MG., Matterson, J., Chen, JW., Williams, MA., Fukuda, M. (1990)  
Two human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2,  
are encoded by genes localized to chromosome 13q34 and  
chromosome Xq24-25, respectively  
J Biol Chem, 265(13), 7548-7551
- 75 McEuen, A.R., Buckley, M., Compton, S.J., Walls, A.F. (1999)  
Development and characterization of a monoclonal antibody specific for  
human basophils and the identification of a unique secretory product of  
basophil activation  
Laboratory Investigation, 79(1), 27-38
- 76 McEuen, A.R., Calafat, J., Compton, S.J., Easom, N.J.W., Buckley, M.G.,  
Knol, E.F., Walls, A.F. (2001)  
Mass, charge, and subcellular localization of a unique secretory product  
identified by the basophil-specific antibody BB1  
J Allergy Clin Immunol, 107(5), 842-848
- 77 McGuckin, CP., Forraz, N., Baradez, M., Lojo-Rial, C., Wertheim, D.,  
Whiting, K., Watt, SM., Pettengell, R. (2003)  
Colocalization analysis of sialomucins CD34 and CD164  
Stem cells, 21, 162-170
- 78 Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J.,  
Nieuwenhuis, H.K., Clevers, H.C. (1991)  
CD63 antigen: A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a  
screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells  
J Biol Chem, 266 (5), 3239-3245
- 79 Meyaard, L., Hurenkamp, J., Clevers, H., Lanier, LL., Phillips, JH. (1999)  
Leukocyte-associated Ig-like Receptor-1 functions as an  
inhibitory receptor on cytotoxic T cells  
J Immunol, 162, 5800–5804
- 80 Mishima, Y., Matsumoto-Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M.,  
Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H.,  
Hatake, K. (2002)  
Leukemic cell-surface CD13/Aminopeptidase N ans resistance to apoptosis  
mediated yb endothelial cells  
J Natl Cancer Inst, 94(13), 1020-1028

- 81 Mochizuki, A., McEuen, A.R., Buckley, M.G., Walls, A.F. (2003)  
The release of basogranulin in response to IgE-dependent and IgE-independent stimuli: validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation  
*J Allergy Clin Immunol*, 112(1), 102-108
- 82 Monneret, G., Boumiza, R., Gravel, S., Cossette, C., Bienvenu, J., Rokach, J., Powell, WS. (2004)  
Effects of prostaglandin D2 and 5-lipoxygenase products on the expression of CD203c and CD11b by basophils  
*J Pharmacol Exp Ther*, 312(2), 627-634
- 83 Nakatsu, F., Ohno, H. (2003)  
Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network  
*Cell Struct Funct*, 28(5), 419-429
- 84 Navarrete, S.A., Roentsch, J., Danielsen, E.M., Langner, J., Riemann, D. (2000)  
Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes  
*Biochem Biophys Res Commun*, 269(1), 143-148
- 85 Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, JE., Oh, S.J., Koga, Y., Sue, CM., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., Dimauro, S., Hirano, M. (2000)  
Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)  
*Nature*, 406, 906-910
- 86 Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., Arap, W., Ruoslahti, E. (2000)  
Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis  
*Cancer Research*, 60, 722-727
- 87 Petrovic, N., Bhagwat, S.V., Ratzan, W.J., Ostrowski, M.C., Shapiro, L.H. (2003)  
CD13/APN transcription is induced by RAS/MAPK-mediated phosphorylation of Ets-2 in activated endothelial cells  
*J Biol Chem*, 278(49), 49358-49368

- 88 Prussin, C., Metcalfe, DD. (2003)  
IgE, mast cells, basophils, and eosinophils  
*J Allergy Clin Immunol*, 111, 486-494
- 89 Ravetch, J.V., Lanier, L. (2000)  
Immune inhibitory receptors  
*Science*, 290, 84-89
- 90 Roessner, A., Kruger, S., Kido, A. (2000)  
Cellular proteases and invasion  
*Verh Dtsch Ges Pathol*, 84, 69-76
- 91 Rous, BA., Reaves, BJ., Ihrke, G., Briggs, JA., Gray, SR., Stephens, DJ.,  
Banting, G., Luzio, JP. (2002)  
Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type  
and mutated CD63 to lysosomes  
*Mol Biol Cell*, 13 (3), 1071-1082
- 92 Rubio, V., Stuge, TB., Singh, N., Betts, MR., Weber, JS.,  
Roederer, M., Lee, PP. (2003)  
Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells  
*Nat Med*, 9(11), 1377-1382
- 93 Santos, A.N., Langner, J., Herrmann, M., Riemann, D. (2000)  
Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways  
in monocytes  
*Cell Immunol*, 201(1), 22-32
- 94 Sauer, G., Kurzeder, C., Grundmann, R., Kreienberg, R., Zeillinger, R.,  
Deissler, H. (2003)  
Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values  
is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells  
*Oncol Rep*, 10 (2), 405-410
- 95 Sawada, R., Lowe, JB., Fukuda, M. (1993)  
E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is  
increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal  
membrane glycoprotein-1 expression levels  
*J Biol Chem*, 268(17), 12675-12681
- 96 Schroeder, JT., Macglashan, JR., Lichtenstein, LM. (2001)  
Human basophils: Mediator release and cytokine production  
*Adv Immunol*, 77, 93-122

- 97 Shaikh, RB., Santee, S., Granger, SW., Butrovich, K., Cheung, T., Kronenberg, M., Cheroutre, H., Ware, CF. (2001)  
Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction  
*J Immunol*, 167(11), 6330-6337
- 98 Silverstein, RL., Febbraio, M. (1992)  
Identification of lysosome-associated membrane protein-2 as activation-dependent platelet surface glycoprotein  
*Blood*, 80(6), 1470-1475
- 99 Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Iida, J., Skubitz, A.P. (1996)  
CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18 and transmits an activation signal in neutrophils  
*J Immunol*, 157 (8), 3617-3626
- 100 Soderberg, C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M., Moller, E. (1993)  
CD13 (human aminopeptidase N) mediates cytomegalovirus infection  
*J Virol*, 67(11), 6576-6585
- 101 Sperr, W.R., Agis, H., Czerwenka, K., Klepetko, W., Kubista, E., Boltz-Nitulescu, G., Lechner, K., Valent, P. (1992)  
Differential expression of cell surface integrins on human mast cells and human basophils  
*Ann Hematol*, 65(1), 10-16
- 102 Sturm, G.J., Bohm, E., Trummer, M., Weigelhofer, I., Heinemann, A., Aberer, W. (2004)  
The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study  
*Allergy*, 59 (10), 1110-1117
- 103 Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, EL., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, PML., Blanz, J., Figura, K. von, Saftig, P. (2000)  
Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice  
*Nature*, 406, 902-906
- 104 Tatsumi, E. (2002)  
A mini-review of CD13 antigen in AML: easy induction or enhancement of expression in in vitro culture and necessary consideration for assessment  
*Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 33 Suppl 2, 155-157



- 105 Tohami, T., Drucker, L., Radnay, J., Shapira, H., Lishner, M. (2004)  
Expression of tetraspanins in peripheral blood leukocytes:  
a comparison between normal and infectious conditions  
*Tissue Antigens*, 64 (3), 235-242
- 106 Turner, H., Kinet, J.P. (1999)  
Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI  
*Nature*, 402 Supp., B24-B30
- 107 Valent, P. (1994)  
The phenotype of human eosinophils, basophils, and mast cells  
*J Allergy Clin Immunol*, 94, 1177-1183
- 108 Valent, P. (1995)  
Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils  
and mast cells  
*Exp Dermatol*, 4(4 Pt 2), 255-259
- 109 Valent, P., Majdic, O., Maurer, D., Bodger, M., Muhm, M.,  
Bettelheim, P. (1990)  
Further characterization of surface membrane structures expressed  
on human basophils and mast cells  
*Int Arch Allergy Appl Immunol*, 91(2), 198- 203
- 110 Valent, P., Schmidt, G., Besemer, J., Mayer, P., Zenke, G., Liehl, E.,  
Hinterberger, W., Lechner, K., Maurer, D., Bettelheim, P. (1989)  
Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils  
*Blood*, 73(7), 1763-1769
- 111 Verbrugge, A., Ruiters, T.T., Clevers, H., Meyaard, L. (2003)  
Differential contribution of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory  
motifs of human leukocyte-associated Ig-like receptor-1 to inhibitory  
function and phosphatase recruitment  
*Int Immunol*, 15(11), 1349-1358
- 112 Viitala, J., Carlsson, S.R., Siebert, P.D., Fukuda, M. (1988)  
Molecular cloning of cDNAs encoding lamp A, a human lysosomal  
membrane glycoprotein with apparent Mr~120,000  
*Proc Natl Acad Sci*, 85, 3743-3747
- 113 Voehringer, D., Rosen, D.B., Lanier, L.L., Locksley, R.M. (2004)  
CD200 receptor family members represent novel DAP12-associated  
activating receptors on basophils and mast cells  
*J Biol Chem*, 279(52), 54117-54123

- 114 Watt, SM., Bühring, HJ., Rappold, I., Chan, JY., Lee Prudhoe, J., Jones, T., Zannettiono, AC., Simmons, PJ. Doyonnas, R., Sheer, D., Butler, LH. (1998)  
CD164, a novel sialomucin on CD34+ and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21  
*Blood*, 92, 849-866
- 115 Weber, M., Uguccioni, M., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I., Dahinden, C.A. (1996)  
Deletion of the NH2-terminal residue converts monocyte chemotactic protein 1 from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant  
*J Exp Med*, 183(2), 681-685
- 116 Weck, AL., Sanz, ML. (2003)  
For allergy diagnostic flow cytometry, detection of CD203c instead of CD63 is not at all an improvement in other hands  
*Clin Exp Allergy*, 33, 849-853
- 117 Williams, MA., Fukuda, M. (1990)  
Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine Residue at a particular position in the cytoplasmic tail  
*J Cell Biol*, 111, 955-966
- 118 Wimazal, F., Ghannadan, M., Muller, MR., End, A., Willheim, M., Meidlinger, P., Scherthaner, GH., Jordan, JH., Hagen, W., Agis, H., Sperr, WR., Czerwenka, K., Lechner, K., Valent, P. (1999)  
Expression of homing receptors and related molecules on human mast cells and basophils: a comparative analysis using multi- color flow cytometry and toluidine blue/immunofluorescence staining techniques  
*Tissue Antigens*, 54, 499-507
- 119 Wright, GJ., Cherwinski, H., Foster-Cuevas, M., Brooke, G., Puklavec, MJ., Bigler, M., Song, Y., Jenmalm, M., Gorman, D., McClanahan, T., Liu, MR., Brown, MH., Sedgwick, JD., Phillips, JH., Barclay, AN. (2003)  
Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200  
*J Immunol*, 171(6), 3034-3046
- 121 Yano, Y., Hayashi, Y., Sano, K., Shinmaru, H., Kuroda, Y., Yokozaki, H., Yoon, S., Kasuga, M. (2003)  
Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma  
*Int J Mol Med*, 12(5), 763-766

- 122 Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellichio, C.B. Shapiro, L.H., Look, A.T., Holmes, K.V. (1992)  
Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E  
Nature, 357(6377), 420-422
- 123 Zannettiono, AC., Bühring, HJ., Niuitta, S., Watt, SM., Benton, MA., Simmons, PJ. (1998)  
The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis  
Blood, 92, 2613-2628
- 124 Zhang, S., Cherwinski, H., Sedgwick, JD., Phillips, JH. (2004)  
Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation  
J Immunol, 1;173(11), 6786-6793
- 125 Ziaber, J., Baj, Z., Pasnik, J., Chmielewski, H., Tchorzewski, H. (2000)  
Expression of aminopeptidase N (APN) on peripheral blood mononuclear cell's surface as a marker of these cells' transendothelial migration properties in the course of multiple sclerosis  
Mediators Inflamm,9(1), 45-48
- 126 Zola, H., Swart, B., Katz, K.S., Shaw, S. (2002)  
Protein reviews on the web  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/>

# Bezugsquellenverzeichnis

Acrylamid	Roth, Deutschland
Ammoniumpersulphat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
anti-CD203c-PE (97A6)	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD63-FITC (H5C6)	PharMingen, San Diego, USA
anti-IgE, goat	ICN Biomedicals, USA
$\beta$ - Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Bisacrylamid	Roth, Deutschland
Bromophenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Deoxycholsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
EDTA	Bio-Whittaker, Walkersville, Maryland, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Glycerol	Universitätsapotheker Tübingen
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
HCl 99%	Merck, Deutschland
Mausimmunglobulin	SouthernBiotech, USA
Monovetten	SARSTEDT S-Monovetten R°, 5,5 ml Li-Heparin, Nümbrecht, Deutschland
Natrium-Acid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
NP-40 substitute	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Optilyse B	Immunotech, Marseille, Frankreich
PBS Dulbeccos	Invitrogen, Corporation, England
Phl p 1, 5 und 6	Biomay, Wien, Österreich
polyclonal rabbit anti mouse FITC	DakoCytomation, Dänemark
polyclonal rabbit anti mouse PE	DakoCytomation, Dänemark
Polyglobin 10%	Bayer AG, Deutschland
Protein G Sepharose 4 fast flow	Amersham Biosciences, Schweden
SDS	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
TPA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Tris base	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Wortmannin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

## Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Dr. Hans-Jörg Bühring und Prof. Dr.med. Tilo Biedermann für die Überlassung des interessanten Themas.

Meinem Betreuer Dr. Bühring möchte ich sehr herzlich für seine uneingeschränkte Unterstützung und sein unermüdliches Interesse für diese Arbeit danken. Insbesondere dafür, dass er mir eine eigene Publikation ermöglicht hat.

Ebenso zum Erfolg haben die „guten Geister“ des Labors Sabrina Tremel und Astrid Schmitt beigetragen. Nicht nur für ihre freundliche Unterstützung in den praktischen Fragen der Laborarbeit, sondern auch für die äusserst freundliche Laboratmosphäre bin ich ihnen zu Dank verpflichtet.

Besonders möchte ich auch Katharina Baumgärtner danken, die mich unter anderem bei der Immunfluoreszenzmikroskopie tatkräftig unterstützt hat und für einige Experimente ihr Blut zur Verfügung gestellt hat. Anna Streble danke ich neben der Einführung in die FACS- Analyse für anregende Diskussionen und interessante Ideen.

Dem Tübinger Proteomcenter von Professor Nordheim sei für die Durchführung der Massenspektrometrie gedankt.

Schließlich möchte ich meiner Familie für ihr motivierendes Interesse am Zustandekommen dieser Arbeit danken. Insbesondere meiner Mutter Johanna Hennersdorf, meinem Bruder Thomas und seiner Frau Natalie, denen diese Arbeit gewidmet ist.

# Lebenslauf

von Immanuel Florian Hennersdorf

- |             |   |
|-------------|---|
| 31.5.1978   | geboren in Stuttgart Bad-Cannstatt  |
| 1985- 1998  | Besuch der Freien Waldorfschule Ulandshöhe in Stuttgart   |
| Juni 1998   | Abitur in Stuttgart   |
| 1998- 1999  | Zivildienst im Katharinenhospital Stuttgart   |
| 1999- 2002  | Studium der Humanmedizin an der Universität Heidelberg  |
| August 2001 | Physikum in Heidelberg  |
| 2001- 2002  | wissenschaftliche Tätigkeit am Europäischen<br>Laboratorium für Molekularbiologie in Heidelberg |
| 2002- 2006  | Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen  |
| August 2003 | Erstes Staatsexamen in Tübingen   |
| März 2005   | Zweites Staatsexamen in Tübingen  |
| Mai 2006    | Drittes Staatsexamen in Stuttgart   |
| 2004- 2006  | Dissertation bei Dr. H-J. Bühring und<br>Professor Dr. T. Biedermann                            |