

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Lothar Kanz**

**Identifizierung und Charakterisierung des differentiell
exprimierten Gens p306 in dendritischen Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Ingo Hilgendorf

aus

Haifa

2008

Dekan:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Salih

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Die angeborene Immunität.....	1
1.1.2	Die erworbene Immunität.....	2
1.1.3	Dendritische Zellen, Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität.....	6
1.1.3.1	Subpopulationen von dendritischen Zellen in-vivo und in-vitro.....	8
1.2	Molekulare Genetik.....	11
1.2.1	Transkription.....	12
1.2.1.1	RNA-Prozessierung.....	13
1.2.1.2	Transkriptionale und posttranskriptionale Kontrolle.....	14
1.2.2	Translation.....	16
1.2.2.1	Translationale Kontrolle und posttranslationale Modifikation.....	17
1.3	Das differentiell exprimierte Gen p306.....	19
1.3.1	Vorarbeiten.....	19
1.3.2	Zielsetzung.....	23
2	Material.....	24
2.1	Geräte.....	24
2.2	Verbrauchsmaterial.....	26
2.3	Reagenzien.....	28
2.3.1	Antikörper.....	28
2.3.2	Chemikalien, Nukleotide und Peptide.....	29
2.3.3	Kits.....	32
2.3.4	Medien.....	32
2.3.5	Zytokine.....	33
2.3.6	Puffer.....	34
3	Methoden.....	35
3.1	Zellkultur.....	35
3.1.1	Gewinnung von mononuklären Zellen aus peripherem Blut mittels Adhärenz.....	35

3.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	36
3.1.3	Generierung von Monozyten mittels Adhärenz	37
3.1.4	Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten	37
3.1.5	Generierung von dendritischen Zellen aus CD34 ⁺ Vorläufer-zellen ..	38
3.1.6	Generierung von makrophagenähnlichen Zellen.....	38
3.2	<i>Magnetic Associated Cell Sorting</i> (MACS)	38
3.2.1	Isolierung von Monozyten durch MACS	39
3.2.2	Isolierung von T-Lymphozyten durch MACS	39
3.2.3	Isolierung von B-Lymphozyten durch MACS.....	40
3.2.4	Isolierung von <i>Blood Dendritic Cells</i> durch MACS	40
3.2.5	Isolierung von plasmazytoiden (lymphatischen) dendritischen Zellen durch MACS	40
3.2.6	Isolierung von CD1c (BDCA-1) ⁺ myeloide dendritische Zellen durch MACS.....	41
3.3	Durchflusszytometrie	41
3.4	Herstellung des Proteinlysats	43
3.4.1	Proteinlysat von adhärennten Monozyten	43
3.4.2	Proteinlysat von Zellen in Suspension.....	43
3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
3.6	Proteinauftrennung durch Gelelektrophorese	44
3.7	Western Blot.....	46
3.8	RNA-Isolierung	48
3.9	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	49
3.10	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	49
3.10.1	cDNA-Synthese.....	51
3.10.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
3.10.3	Agarosegelelektrophorese	55
4	Ergebnisse	55
4.1	Phänotypisierung durch FACS-Analysen.....	55
4.1.1	FACS-Analyse von MACS-isolierten Monozyten.....	55
4.1.2	FACS-Analyse von mDC.....	57
4.1.3	FACS-Analyse von CD34 DC.....	59

4.1.4	FACS-Analyse von MACS-isolierten <i>Blood DC</i>	60
4.1.5	FACS-Analyse von MACS-isolierten plasmazytoiden DC	60
4.1.6	FACS-Analyse von MACS-isolierten myeloiden CD1c ⁺ DC	61
4.1.7	FACS-Analyse von makrophagenähnlichen Zellen	63
4.1.8	FACS-Analyse von MACS-isolierten T-Lymphozyten.....	65
4.1.9	FACS-Analyse von MACS-isolierten B-Lymphozyten	67
4.2	Nachweis der differentiellen Genexpression von p306 in mDC	68
4.3	Untersuchung der differentiellen Genexpression von p306 durch PCR mit verschiedenen Primern	71
4.4	Untersuchung der Kinetik der Genexpression von p306	74
4.5	Untersuchung der Regulierbarkeit der Genexpression von p306 durch Stimulatoren und Inhibitoren.....	76
4.6	Untersuchung der Genexpression von p306 in makrophagen- ähnlichen Zellen	78
4.7	Untersuchung der differentiellen Genexpression von p306 in anderen Zelllinien	79
4.8	Analyse der Proteineigenschaften von P306.....	80
5	Diskussion	81
5.1	Nachweis der differentiellen Expression des Gens p306 in mDC mittels RT-PCR und Untersuchungen zum alternativen Spleißen.....	81
5.2	Nachweis der differentiellen Expression des Gens p306 in mDC mittels Western Blot	83
5.3	Kinetik der p306-Genexpression	86
5.4	Stimulation und Repression der p306-Genexpression	87
5.5	Vorkommen der p306-Genexpression in verschiedenen Zelltypen	88
5.6	Ausblick	90
6	Zusammenfassung	90
7	Abkürzungsverzeichnis.....	93
8	Tabellenverzeichnis.....	97
9	Abbildungsverzeichnis.....	98
10	Literaturverzeichnis	99
10.1	Alphabetisches Literaturverzeichnis	99

10.2 Numerisches Literaturverzeichnis.....	110
11 Danksagung.....	122
12 Lebenslauf.....	124

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen dient im Allgemeinen dazu, unseren Körper vor Infektionen durch pathogene Mikroorganismen oder vor schädlichen Stoffwechselprodukten und Toxinen zu schützen und anormale Körperzellen zu eliminieren. Es stellt ein komplexes System dar, welches auf das Wechselspiel von zellulären und nichtzellulären Bestandteilen und Mechanismen beruht. Zur Charakterisierung des Immunsystems bietet sich die Unterteilung in eine angeborene (native) und eine erworbene (adaptive) Immunität an. Die vielfältigen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems stellen dabei räumlich und zeitlich die erste Verteidigungslinie unseres Körpers dar. Werden diese ersten Abwehrmechanismen vom Pathogen überwunden, wird eine adaptive Immunantwort ausgelöst. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität, kann das erworbene Immunsystem antigenspezifisch und damit effektiver reagieren. Zudem trägt es dazu bei, ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen, welches vor erneuten Infektionen schützen soll. Angeborene und erworbene Immunität nutzen jedoch viele Effektormechanismen gemeinsam und hängen entscheidend voneinander ab.

1.1.1 Die angeborene Immunität

An der angeborenen Abwehr sind folgende Komponenten vorrangig beteiligt. An erster Stelle stehen die mechanischen und chemischen Barrieren der Oberflächenepithelien und Sekrete, sowie die normale Mikroorganismenflora. Eine entscheidende Rolle spielt die zelluläre Abwehr durch Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und Phagozyten, wozu in erster Linie Makrophagen und neutrophile Granulozyten gezählt werden. Sowohl die Phagozytose als auch der Einbau von Perforinen und die Induktion von Apoptose in den Zielzellen verlaufen rezeptorvermittelt. Bei der Phagozytose werden allgemein und häufig vorkommende Oberflächenmolekülmuster der Pathogene durch Rezeptoren wie dem Makrophagen-Mannoserezeptor oder den *Scavenger*-Rezeptoren erkannt. Über Rezeptoren der *Toll-like receptor* Familie wird hingegen keine

Phagozytose, sondern die Produktion von Mediatoren und kostimulierenden Molekülen eingeleitet. TLR-4 ist beispielsweise für die Erkennung von Lipopolysacchariden und damit für die Einleitung der Immunantwort gegen gramnegative Erreger verantwortlich, während TLR-2 Proteoglykane grampositiver Erreger oder bakterielle Lipoproteine erkennt^{1, 2}. Eines der wichtigsten Mechanismen der angeborenen Immunität ist das Komplementsystem, welches durch Opsonierung von Pathogenen deren Phagozytose über Komplementrezeptoren einleitet oder selbst eine Zellyse bewirken kann. Es besteht aus einer Enzymkaskade, die durch die Bindung einzelner Komponenten an Pathogenoberflächen oder Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert wird. Die kleinen Komplementpeptide C3a, C4a und C5a lösen eine lokale Entzündungsreaktion aus, die sich in einer erhöhten Durchblutung und Gefäßpermeabilität, der Anlockung weiterer Phagozyten und der Aktivierung von Mastzellen ausdrückt, die ihrerseits durch die Freisetzung von Histaminen und $\text{TNF}\alpha$ zur Entzündungsreaktion beitragen. Ebenso sind die von Makrophagen sezernierten Prostaglandine, Leukotriene, der plättchenaktivierende Faktor, Zytokine und Chemokine an der Entzündungsreaktion beteiligt. Wichtige Zytokine sind IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ die neben der lokalen Entzündungsreaktion auch systemische Effekte wie Fieber oder die Akute-Phase-Reaktion auslösen, und das Zytokin IL-12, welches NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen aktiviert und die Typ 1-Differenzierung von T-Helferzellen induziert. Mit Fortdauern der Entzündungsreaktion wird eine Überleitung in die adaptive Immunantwort vollzogen. Zytokine und Chemokine bewirken eine Mobilisierung und Differenzierung von Effektorzellen des erworbenen Immunsystems und die Expression kostimulierender Moleküle auf Phagozyten verstärkt die Aktivierung spezifischer T-Zellen.

1.1.2 Die erworbene Immunität

Die erworbene Immunität beruht im Gegensatz zur angeborenen Immunität auf einer antigenspezifischen Immunantwort über Rezeptoren, die gegen einzelne spezifische Epitope von Antigenen gerichtet sind. Dadurch wird deutlich, dass eine enorme Diversität von Antigenrezeptoren nötig ist, die durch die Lympho-

zyten des adaptiven Immunsystems mittels Genumlagerung und -umordnung erbracht wird. Die Lymphozyten kommen in Form von antigenspezifischen Klonen vor, wobei die Zellen eines Klons dieselben Antigenrezeptoren tragen und sich von den Rezeptoren der anderen Klone unterscheiden. Die Antigen-spezifität der Lymphozyten ist auch für die Bildung der Gedächtniszellen und der sekundären Immunantwort bei erneutem Antigenkontakt verantwortlich. Dabei bleiben die allgemeinen Prinzipien des Immunsystems, die Selbstbeschränkung der Immunantwort und die Eigentoleranz, gewahrt. Grundsätzlich kann man T- von B-Lymphozyten unterscheiden, wobei auch die NK-Zellen des angeborenen Immunsystems den Lymphozyten zugeordnet werden.

B-Zellen können mit Hilfe ihrer membrangebundenen Immunglobulin-Rezeptoren fremde Proteine, Polysaccharide, Nukleinsäuren und Lipide primär in löslicher Form erkennen. Der Antigenkontakt bewirkt dann die Differenzierung zu Plasmazellen, die antigenspezifische Antikörper sezernieren. Die Bindung der Antikörper an die Pathogene unterstützt und verstärkt wiederum die Abwehrmechanismen der nativen Immunität durch Initiation der rezeptorvermittelten Phagozytose und durch Aktivierung von NK-Zellen und Komplementsystem. Die Antikörperantwort der B-Zellen auf Proteinantigene ist aber auf zusätzliche Signale durch T-Helferzellen und follikuläre dendritische Zellen angewiesen. Die gebundenen Antigene werden von der B-Zelle internalisiert und den T-Helferzellen auf Klasse II MHC-Molekülen präsentiert. Die spezifischen T-Helferzellen erkennen das präsentierte Antigen und interagieren mit der B-Zelle einerseits über die Ausbildung des CD40 – CD40-Ligand-Komplexes und andererseits über die Ausschüttung von Zytokinen, die die Proliferation, die Differenzierung und den Antikörperisotyp beeinflussen. Auch die Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation der variablen Antikörperregionen und letztlich die Ausbildung von B-Gedächtniszellen ist abhängig von der Interaktion mit T-Helferzellen, dendritischen Zellen der Keimzentren (*Germinal Center Dendritic Cells*) und dendritischen Follikelzellen in den Keimzentren der B-Zell-Follikel^{3, 4}. Die follikulären dendritischen Zellen stellen eine Sondergruppe von dendritischen Zellen dar. Sie entstammen nicht

einer hämatopoetischen Stammzelle (CD45⁺), exprimieren keine MHC-II-Moleküle und phagozytieren nicht. Dennoch werden sie zu den antigenpräsentierenden Zellen gezählt, da sie über Fc- und Komplementrezeptoren Immunkomplexe binden.

T-Lymphozyten sind bedingt durch die Eigenart des T-Zellrezeptors (TCR) im Gegensatz zu B-Zellen grundsätzlich auf die Antigenpräsentation von Peptidfragmenten auf MHC-Molekülen angewiesen. Der TCR-Komplex setzt sich aus einem $\alpha\beta$ -Heterodimer, der die variablen Regionen für die Antigenerkennung beinhaltet, und assoziierten Proteinen wie den CD3-Proteinen zusammen. Ein kleiner Anteil an T-Zellen, wie zum Beispiel einige intraepitheliale Lymphozyten, exprimieren stattdessen einen $\gamma\delta$ -TCR, der teilweise ein sehr eingeschränktes Spektrum an variablen Regionen aufweist und nicht MHC-restringiert arbeitet. Neben dem TCR spielen für die Signalübertragung und T-Zell-Aktivierung mehrere akzessorische Moleküle wie zum Beispiel die Korezeptoren CD4, CD8, CD28 und CD40-Ligand oder Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und CD2 eine entscheidende Rolle. Man unterscheidet darauf basierend eine CD4⁺ T-Zellpopulation, die mit Klasse II MHC-Molekülen interagiert, von einer CD8⁺ T-Zellpopulation, die über Klasse I MHC-Moleküle bindet. Hauptvertreter der CD4⁺ T-Zellen sind die bereits beschriebenen T-Helferzellen. Sie lassen sich auf Grund von typischen Zytokinmustern unterteilen in T_H1-Zellen, die vor allem IL-2, IL-12 und IFN γ produzieren, und T_H2-Zellen, die vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 ausschütten. IL-2 wirkt dabei als autokriner und parakriner Proliferationsfaktor auf T-Zellen, aktiviert B-Zellen und NK-Zellen und regt die vermehrte Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , TNF α und Lymphotoxin (TNF β) an. IFN γ ist der stärkste Makrophagen aktivierende Faktor und verstärkt deren Phagozytoseaktivität. Es fördert die Zytotoxizität der NK-Zellen und die Fähigkeit zahlreicher Zellen Antigene auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen zu präsentieren³. Die T_H1-Zellen stimulieren folglich die zelluläre Immunantwort. T_H2-Zellen wirken hingegen über IL-4, IL-10 und IL-13 hemmend auf Makrophagen. Sie sind jedoch entscheidend an der humoralen spezifischen Immunantwort durch B-Zell-Aktivierung und damit der Aus-

schüttung opsonierender und neutralisierender Antikörper beteiligt. IL-4 kann zudem den Wechsel der Antikörperisotypenform zu IgE bewirken und IL-5 ist ein starker Eosinophilen aktivierender Faktor. Die T_H2 -vermittelte Immunantwort spielt folglich auch bei allergischen Reaktionen und der Abwehr von Wurmparasiten eine zentrale Rolle. Die Differenzierung einer naiven T-Helferzelle in eine T_H1 - oder T_H2 -Zelle wird durch vielerlei Faktoren bestimmt wie zum Beispiel Art, Reifegrad und Wirkungsdauer der antigenpräsentierenden Zellen sowie maßgeblich durch die Wirkung von Zytokinen wie IL-12 und $IFN\gamma$, die eine T_H1 -Polarisation, oder IL-4, IL-10 und $TGF\beta$, die eine T_H2 -Polarisation bewirken³⁻⁵.

Die $CD8^+$ T-Zellen sind neben der Ausschüttung von Zytokinen wie $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $TNF\beta$ und IL-2 auch zur antigenspezifischen Zelllyse fähig und werden deshalb den zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) zugeordnet. Auf Grund des Korezeptors CD8 können nur auf MHC-I präsentierte Antigene vom TCR erkannt werden, und über akzessorische Moleküle wird ähnlich wie bei den T-Helferzellen die Bindung an die Zielzellen verstärkt. Die osmotische Zelllyse wird darauf durch Exozytose porenbildender Perforine eingeleitet. Durch die Ausschüttung von Granzymen und die Bindung des Fas-Liganden wird zusätzlich die Apoptose der Zielzellen ausgelöst. Damit antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen zu lysefähigen zytotoxischen Lymphozyten differenzieren (*priming*), bedarf es jedoch der Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen über deren kostimulatorischen Molekülen wie den B7-Molekülen CD80 und CD86, die an den CD28 Rezeptor der T-Zellen binden.

Auch NK-Zellen wirken auf ähnliche Weise zytotoxisch. Sie tragen allerdings weder antigenspezifische B- noch T-Zell-Rezeptoren sondern unveränderliche Rezeptoren, die Oberflächenmuster infizierter oder neoplastischer Zellen erkennen können. Sie wirken daher früh in der nativen Immunantwort stimuliert durch Interferone und die Zytokine IL-2 und IL-12 und sind ihrerseits zur Sekretion von $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ fähig^{3,4}.

1.1.3 Dendritische Zellen, Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität

Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen sind das entscheidende Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. Unter ihnen sind die dendritischen Zellen (DC) die potentesten bezüglich der Aktivierung von T-Zellen. Sie stammen von einem CD34⁺ Vorläufer im Knochenmark ab und stellen eine heterogene Gruppe von Leukozyten dar. Es lassen sich abgesehen von den bereits erwähnten folliculären dendritischen Zellen mehrere myeloide Subpopulationen, zu denen die epidermalen Langerhans-Zellen und verschiedene interstitielle DC zählen, von einer lymphatischen Subpopulation, den plasmazytoiden DC, unterscheiden ⁶. Die myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen zirkulieren im Blut und wandern schließlich als unreife dendritische Zellen stimuliert durch Chemokine in die peripheren Gewebe ein. Auf ihrer Zelloberfläche finden sich noch wenige MHC-Moleküle und praktisch keine kostimulatorischen Moleküle ⁷. In diesem Entwicklungsstadium sind die Zellen darauf spezialisiert möglichst viele Antigene aufzunehmen. Die Antigenaufnahme erfolgt über rezeptorvermittelte Phagozytose oder über konstitutive Makropinozytose. Zu den Rezeptoren gehören unter anderem verschiedene Fc-Rezeptoren, die Komplementrezeptoren CR3 und CR4 und Rezeptoren, die die Hitzeschockproteine Hsp70 und gp96 binden. Der *Scavenger*-Rezeptor CD36 bindet bestimmte Lipoproteine und ist vor allem im Komplex mit Integrinen an der Aufnahme apoptotischer Zellkörper beteiligt. Der Makrophagen-Mannose-Rezeptor und DEC205 gehören zur Rezeptorfamilie der C-Typ Lektine. Langerin zählt zu den Typ II Lektinen und ist für die Ausbildung spezieller Phagosomen, den Birbeck Granula, in Langerhans-Zellen verantwortlich. Durch zusätzliche Signale werden die unreifen DC aktiviert und entwickeln sich zu reifen DC. Dazu zählen die Bindung von bakteriellen Zellwandbestandteilen, viraler RNA und unmethylierter CpG-Oligodesoxynukleotiden bakterieller oder viraler DNA an die entsprechenden *Toll-like* Rezeptoren sowie die Bindung von Immunglobulinen an Fc-Rezeptoren und die spezifische Bindung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF α und Prostaglandin E₂. Die Reifung bewirkt die vermehrte Antigenprozessierung und Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche

gemeinsam mit den kostimulierenden Molekülen B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) und CD40. Gleichzeitig werden die Phagozytoseaktivität und das *Recycling* von beladenen MHC-II-Molekülen heruntergefahren. Während des Reifungsprozesses wandelt sich also die dendritische Zelle von einem Phagozyten zu einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle. Damit einhergehend werden die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CCR6 herunterreguliert, während CCR7 exprimiert wird. An CCR7 binden das Sekundäre Lymphatische Chemokin und das *Macrophage Inflammatory Protein* MIP-3 β , welche von den Stromazellen der T-Zell-Regionen, den Venolen mit hohem Endothel (HEVs) oder reifen DC in den sekundären lymphatischen Organen gebildet werden ^{8,9}. Die reifen antigenpräsentierenden DC wandern den Chemokingradienten folgend in die T-Zell-Regionen ein ^{7, 10}. Hier produzieren sie ihrerseits unter anderem das DC-spezifische Chemokin DC-CK 1 (CCL18) ¹¹ und MIP-3 β und locken damit naive T-Zellen ebenfalls in die T-Zellregion. Erkennen die naiven antigenspezifischen T-Zellen ein präsentiertes Fremdantigen, werden sie aktiviert und interagieren mit den DC. Ansonsten treten sie in die efferente Lymphbahn ein und setzen ihre fortwährende Rezirkulation zwischen Lymphorganen und Blut fort. Die antigenspezifische Wechselwirkung zwischen T-Zellen und DC kann jedoch nur unter der Voraussetzung der Bindung adhäsiver und kostimulatorischer Moleküle stattfinden. Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen zählen LFA-1, CD2 und ICAM-3 (CD50) auf der T-Zelle, die entsprechend an ICAM-1 (CD54) bzw. ICAM-2 (CD102), LFA-3 (CD58) und DC-SIGN binden. Durch die Bindung der kostimulatorischen B7-Moleküle an CD28 auf der T-Zelle wird diese aktiviert und zur klonalen Proliferation angeregt. Aktivierte T-Zellen exprimieren im weiteren Verlauf das inhibitorische Molekül CTLA-4 (CD152), welches die B7-Moleküle affiner zu binden vermag als CD28 und das Proliferationssignal wieder beendet. Von großer Bedeutung ist die Interaktion zwischen dem CD40-Ligand der T-Zelle und CD40 auf den DC, welche aktivierende Signalwirkungen auf beide Zellen auslöst ⁴. Die dendritischen Zellen werden zur Produktion weiterer kostimulierender Moleküle und Zytokine angeregt, die die Proliferation der T-Zellen verstärken und offensichtlich steuern. Zusätzlich aktivieren die DC über *cross-priming*

CD8⁺ CTL. Auf der anderen Seite bewirkt das Fehlen kostimulatorischer Signale bei antigenspezifischer Bindung des T-Zellrezeptors an MHC-Moleküle eine Inaktivierung naiver T-Zellen und deren Versetzung in den Zustand der Anergie, in dem sie nicht mehr auf Antigene reagieren können. Dieser Mechanismus spielt in der Induktion der peripheren Eigentoleranz durch dendritische Zellen eine wichtige Rolle. Dendritische Zellen sind darüber hinaus auch für die Induktion der zentralen Eigentoleranz im Thymus durch negative Selektion autoreaktiver T-Zellen verantwortlich ¹².

1.1.3.1 Subpopulationen von dendritischen Zellen in-vivo und in-vitro

Die Einteilung und Ordnung der DC-Subtypen in diskrete Zelllinien gestaltet sich schwierig, da sich dendritische Zellen je nach Aufenthaltsort und Entwicklungsstadium phänotypisch und funktionell unterscheiden können. Man geht jedoch davon aus, dass alle dendritischen Zellen mit Ausnahme der folliculären dendritischen Zellen von einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark abstammen. Daraus entwickeln sich Vorläuferzellen einer myeloiden und lymphatischen Zelllinie. Im Blut finden sich die CD11c⁺ Pre-DC1 als gemeinsame Vorläufer der myeloiden Zellen und CD11c⁻ Pre-DC2, die die lymphatischen Vorläuferzellen stellen. Sie weisen die lymphatischen Marker CD2, CD5 und CD7 jedoch nicht die myeloiden Marker CD11c, CD13 und CD33 auf ^{13, 14}. Aus den Vorläufern bilden sich einerseits die Gruppe der DC1, die epidermalen Langerhanszellen und interstitiellen dendritischen Zellen, und andererseits die DC2, die auf Grund ihres plasmazellähnlichen Aussehens auch plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) genannt werden ^{15 - 17}. Diese Auffassung wird dadurch gestützt, dass sich humane CD34⁺ hämatopoetische Progenitorzellen in vitro durch Zugabe von GM-CSF und TNF α nach 12 Tagen in eine gemischte Zellpopulation mit funktionsfähigen DC entwickeln, die MHC-II, CD1a, CD4, CD40, CD54, CD80, CD83 und CD86, jedoch nicht CD14, FC γ RI (CD64) und CR1 (CD35) exprimieren. Diese dendritischen Zellen lassen sich in zwei Subtypen einteilen. Der eine DC-Typ weist Birbeck Granula, das Lag-Antigen und E-Cadherin auf, welche charakteristischerweise von epidermalen Langerhanszellen exprimiert

werden. Der andere Typ weist hingegen keines dieser Merkmale auf, sondern bildet stattdessen CD2, CD9, CD68 und Faktor XIIIa wie die interstitiellen dendritischen Zellen aus. Durch Zugabe von c-kit- oder Flt3-Ligand kann die Ausbeute an *CD34⁺ cell-derived DC* erhöht werden ^{6, 18, 19}. Untersuchungen der Phänotypen am Tag 5 ergeben zwei diskrete intermediäre Vorläuferzellarten, einen CD1a⁺ CD14⁻ und einen CD1a⁻ CD14⁺ Typ, der den Monozyten entspricht. Aus den CD1a⁺ CD14⁻ entwickeln sich die Zellen vom Typ Langerhans-Zelle, während die CD1a⁻ CD14⁺ Zellen zum interstitiellen Typ ausreifen ²⁰. Alternativ können sich aus den Monozyten mit oder ohne Zugabe von M-CSF makrophagenähnliche Zellen bilden, die MHC-II und CD14 exprimieren und kaum CD1a, CD80 oder CD86 ^{6, 21}. Dementsprechend lassen sich dendritische Zellen auch direkt aus Monozyten des peripheren Bluts herstellen. Monozyten entwickeln sich durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 zu unreifen dendritischen Zellen vom interstitiellen Typ, die nur geringfügig CD80 und CD86 exprimieren und noch typische Monozyten-Marker wie CD11b, CD36, CD68 und c-fms aufweisen. Sie lassen sich daher durch Zugabe von M-CSF zu Makrophagen differenzieren. Erhalten die unreifen dendritischen Zellen jedoch Reifungssignale durch Inkubation mit IL-1, TNF α , LPS oder CD40-Ligand, differenzieren sie zu reifen DC aus, wobei sie die Monozyten-Marker herunter- und akzessorische Moleküle wie CD80, CD83 und CD86 hochregulieren ²².

Die plasmazytoiden DC sind phänotypisch als CD11c⁻ und als CD4⁺, CD45RA⁺, CD123⁺ definiert. Sie finden sich im Thymus und vor allem in den T-Zell-Zonen der sekundären Lymphorgane in der Umgebung der HEVs, was darauf hinweist, dass sie über das Blut und nicht wie myeloide DC über die afferenten Lymphbahnen einwandern ^{15, 23 - 26}. Anders als Pre-DC1 lassen sich Pre-DC2 nicht durch GM-CSF oder M-CSF in Makrophagen umwandeln. Dennoch können entsprechend der Hypothese einer gemeinsamen Vorläuferzelle der dendritischen Zellen auch aus CD34⁺ CD45RA⁻ multipotenten hämatopoetischen Stammzellen durch Inkubation mit Flt3-Ligand nach über zehn Tagen Pre-DC2 in-vitro generiert werden ²⁷. Plasmazytoide DC zeichnen sich durch spezifische phänotypische Besonderheiten aus. Im Unterschied zu DC1

tragen sie keine CD1-Moleküle, TLR-2, TLR-3, TLR-4 oder TLR-8, sondern exprimieren in starkem Ausmaß TLR-7 und TLR-9²⁸. Ebenso spezifisch sind das C-Typ Lektin BDCA-2, über das sie Antigene aufnehmen können, und das damit assoziierte BDCA-4-Molekül^{29,30}. Damit einhergehend ergeben sich auch funktionelle Unterschiede zwischen myeloiden und plasmazytoiden DC. Während sich beide Zelltypen durch Bindung des CD40-Liganden zu reifen dendritischen Zellen und starken Stimulatoren von T-Zellen differenzieren lassen^{5,27}, weisen pDC im Unterschied zu myeloiden dendritischen Zellen in praktisch allen Entwicklungsstufen relativ schwache Phagozytose- und Makropinozytoseaktivitäten auf¹⁵. Außerdem produzieren sie nur sehr geringe Mengen an IL-12 verglichen mit myeloiden DC. Die starke IL-12-Produktion der myeloiden DC kann dabei eine Differenzierung der T-Zellen in T_H1 einleiten. Die charakteristische Eigenschaft der plasmazytoiden DC ist jedoch ihre Fähigkeit nach viraler Stimulation große Mengen der Typ I Interferone α und β zu bilden. Dabei spielen die angesprochenen *Toll-like* Rezeptoren 7 und 9 der pDC, über die sie virale ssRNA beziehungsweise dsDNA erkennen, eine zentrale Rolle³¹. Typ I Interferone hemmen die virale Replikation in infizierten Zielzellen und unterstützen die adaptive antivirale Immunantwort durch die Förderung der Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen. Durch Virenkontakt differenzieren pDC zu reifen dendritischen Zellen, die wiederum eine T_H1-Antwort medieren. Im Unterschied zu T-Zellen, die durch myeloide DC über IL-12 aktiviert wurden, produzieren diese T_H1 sowohl IFN γ als auch IL-10^{17,32,33}. Darüber hinaus sind pDC unverzichtbar für die B-Zellaktivierung und -reifung bei viralen Infektionen³⁴. Werden allerdings unreife pDC mit IL-3 und CD40-Ligand aktiviert, wie es bei parasitären Infektionen mit Mastzell- und Eosinophilenaktivierung vorstellbar ist, bewirken sie interessanterweise eine T_H2-Polarisierung, die eine allergische oder antiparasitäre Immunantwort unterstützt. Auch myeloide DC sind bei einem kleinen DC1:T-Zell-Verhältnis, der Zugabe von Prostaglandin E₂, IL-10 oder Kortikosteroiden und längerer Expositionsdauer gegenüber CD40-Ligand (>3 Tage) oder LPS (>12 Stunden) im Stande eine T_H2-Polarisation auszulösen

Man sieht also, dass die komplexe Funktion und Wirkung der dendritischen Zellen nicht allein an ihrer Zugehörigkeit zur einen oder anderen Zelllinie festgemacht werden kann, sondern von einer Vielzahl von Einflussfaktoren abhängt. Nichtsdestotrotz wird die getrennte Betrachtung der DC-Subpopulationen unter Berücksichtigung ihrer spezifischen Eigenarten auch in Zukunft zum besseren Verständnis der Regulation von angeborener und erworbener Immunantwort beitragen.

1.2 Molekulare Genetik

Das menschliche Erbgut ist in Form der DNA gespeichert. Dabei ist die Information durch die variable Abfolge von nur vier verschiedenen Nukleotiden kodiert. Die Nukleotide der DNA bestehen je aus einer fünfwertigen Desoxyribose, an der einerseits am 1'-C-Atom die vier verschiedenen Basen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) und andererseits ein Triphosphatrest am 5'-C-Atom gebunden sind. Sie bilden durch Phosphodiesterbindungen zwischen 3'- und benachbarten 5'-C-Atomen lange Nukleotidketten. Man spricht dementsprechend von 3'- und 5'-Enden der DNA-Stränge. Innerhalb der Chromosomen liegt die DNA doppelsträngig als Doppelhelix um Histone gewunden und hochkompakt geordnet in Chromatinfäden vor. Die Nukleotideinzelstränge sind dabei über komplementäre Basen miteinander verbunden und liegen bezüglich ihrer 5' – 3'-Ausrichtung antiparallel vor. Komplementäre Basenpaare sind A und T sowie G und C. Obwohl jede kernhaltige Körperzelle eines Individuums dieselbe Erbinformation besitzt, unterscheiden sich die einzelnen Zellen in Aussehen und Funktion zum Teil erheblich. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass jeweils nur bestimmte Sequenzen der DNA, die Gene, exprimiert werden. Endpunkte der Expression sind katalytische und strukturelle RNA-Moleküle oder wesentlich häufiger Proteine. RNA unterscheidet sich von DNA dadurch, dass sie als Zuckermolekül Ribose und an Stelle von Thymin die Base Uracil aufweist. Proteine und Peptide sind Polymere aus Aminosäuren und stellen die wichtigsten Funktionsmoleküle der Zellen dar. Sie wirken unter anderem als Strukturproteine, Transportproteine, Rezeptoren, Botenstoffe oder Enzyme. Der

Vorgang der Genexpression wird grob in zwei Abschnitte unterteilt: Die Transkription, bei der DNA in RNA umgeschrieben wird, und die Translation, bei der an Hand einer RNA-Sequenz Proteine synthetisiert werden. Ein Gen enthält aber nicht nur kodierende Bereiche, die die Aminosäuresequenz eines Proteins festlegen, sondern oftmals viel größere Mengen an nicht kodierenden Bereichen, die dennoch entscheidende Signale für die Regulation von Transkription und Translation enthalten. Letztendlich unterliegt die Genexpression auf allen Ebenen einer komplexen Regulation und Kontrolle. Diese Vorgänge sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.2.1 Transkription

Bei der Transkription dient einer der DNA-Stränge, der *antisense*-Strang, der DNA-abhängigen RNA-Polymerase als Matrize, um eine komplementäre RNA-Sequenz zu synthetisieren. Proteinkodierende Gene werden durch die RNA-Polymerase II letztlich in *messenger-RNA* (mRNA) übersetzt. Diese Polymerase ist außerdem für die Synthese von einigen der kleinen Kern-RNAs (snRNA) und kleinen Nukleolus-RNAs (snoRNA) verantwortlich. Die RNA-Polymerasen I und III sind an der Synthese von ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und snRNA beteiligt. Über mehrere allgemeine Transkriptionsfaktoren setzt die RNA-Polymerase unter Bildung eines so genannten Initiationskomplexes an der Promotor-Region eines Gens an, die in 5'-Richtung stromaufwärts vom eigentlichen Transkriptionsstartpunkt liegt. Promotoren haben eine unterschiedliche Stärke, welche sich in der Häufigkeit der Transkription des entsprechenden Gens ausdrückt und von der Nukleotidsequenz der Promotor-Region abhängt. In besonders starken Promotoren finden sich einige sehr ähnliche Bereiche, die man als Konsensussequenzen bezeichnet. Eine der bekanntesten unter ihnen ist die TATA-Sequenz oder TATA-Box. Abweichungen von Konsensussequenzen bewirken eine Abschwächung des Promotors. Der Initiationskomplex trennt die Doppelstränge und die RNA-Polymerase beginnt die Transkription in 5' – 3'-Richtung, wobei der Komplex aus Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung der Polymerase nach wenigen Basenpaaren abgelöst wird⁴¹. Für die Transkription benötigt die RNA-

Polymerase wiederum die Hilfe von Elongationsfaktoren, die die Polymerase auf ihrem Weg durch die kompakte Chromatinstruktur auf dem Matrizenstrang halten. Zusätzlich dienen Topoisomerasen dazu helikale Spannungen abzubauen. Die Termination der Transkription verläuft bei den verschiedenen RNA-Polymerasen teilweise unterschiedlich und hängt beispielsweise von der Bindung spezifischer Terminationsfaktoren oder der Transkription repetitiver Terminationssequenzen ab. Bei der RNA-Polymerase II ist dieser Vorgang eng an die RNA-Prozessierung gekoppelt ⁴².

1.2.1.1 RNA-Prozessierung

Die RNA-Prozessierung läuft in mehreren Schritten schon während der Transkription ab und beinhaltet die Umformung des primären Transkripts, der prä-mRNA, in die reife mRNA, die letztendlich aus dem Zellkern ins Zytosol exportiert wird. Der Vorgang beginnt mit dem *Capping* des 5'-Endes der prä-mRNA mit einem endständigen 7-Methylguanosin-triphosphat über eine Phosphatase, eine Guanyl- und eine Methyltransferase. Anschließend werden durch Spleißen die nicht kodierenden Sequenzen, die Introns, aus der prä-mRNA entfernt. An bestimmten, mehr oder weniger konservierten Sequenzen, den Spleißstellen, setzen Spleißosomen an und fügen durch zweifache Umesterung zwei benachbarte kodierende Bereiche, die Exons, unter Freisetzung einer Intronschlinge zusammen. Spleißosomen setzen sich in der Regel aus fünf verschiedenen snRNAs zusammen, die jeweils mit mehreren Proteinuntereinheiten assoziiert sind und somit kleine Kern-Ribonukleoproteine (snRNP) bilden. Neben den snRNPs, die die Spleißstellen markieren und spalten, sind noch SR-Proteine mit einer serin- und argininreichen Domäne und heterogene Ribonukleotidproteine (hnRNP) am Spleißvorgang beteiligt, indem sie die Exon- und Intronsequenzen markieren und so ebenfalls Spleißstellen abstecken. Das Spleißen bestimmter prä-mRNA-Bereiche kann sowohl während der Transkription als auch nach deren Termination stattfinden. Wird die Terminationssequenz transkribiert, können zwei mit der RNA-Polymerase assoziierte polymere Proteine, der Spaltungsstimulationsfaktor F und der Spaltungs- und Polyadenylierungs-Spezifitätsfaktor, an ihre jeweiligen Erken-

nungssequenzen binden und mit Hilfe weiterer Proteine die prä-mRNA zwischen ihnen spalten. Die poly-A-Polymerase verlängert das freie 3'-Ende durch Polyadenylierung, wobei sich mehrere poly-A-Bindeproteine an die Polymerase heften und die Länge des poly-A-Schwanzes festlegen. Nach dem Abschneiden der prä-mRNA löst sich auch die RNA-Polymerase wieder vom Matrizenstrang und die Transkription ist beendet. Nach der RNA-Prozessierung mit *Capping*, Spleißen und Polyadenylierung wird die entstandene mRNA als gereift bezeichnet. Nur reife mRNA, an deren 5'-Kappe ein *Cap-binding protein* (CBP) und bestimmte andere Kernproteine gebunden sind, werden durch den hochselektiven Kernporenkomplex ins Zytosol transportiert. Fehlerhaft synthetisierte mRNA oder unsinnige mRNA (*nonsense* mRNA) werden im Kern durch das Exosom, einem Proteinkomplex aus mehreren Exonukleasen, abgebaut.

1.2.1.2 Transkriptionale und posttranskriptionale Kontrolle

Die Initiation der Transkription wird nicht nur durch die Stärke des Promotors festgelegt, sondern maßgeblich durch Genregulatorproteine gesteuert, die an spezifische Kontrollsequenzen der DNA zum Teil tausende Basenpaare vom Promotor entfernt binden können. Die Proteine weisen dabei bestimmte Struktur motive auf, mit deren Hilfe sie die spezifischen Nukleotidsequenzen anhand der Oberflächenbeschaffenheit des zugehörigen Abschnitts der DNA-Doppelhelix erkennen. Ein an eine Kontrollsequenz gebundener Genaktivator kann wiederum einzelne allgemeine Transkriptionsfaktoren oder ein Mediatorprotein binden, welches mit der RNA-Polymerase und einigen allgemeinen Transkriptionsfaktoren einen Holoenzymkomplex bildet. Dadurch wird das Ansetzen des Initiationskomplexes an die Promotorregion unterstützt. Außerdem interagieren Genaktivatoren mit Chromatin-modifizierenden Enzymen wie Histon-Acetyltransferasen und Chromatin-Restrukturierungskomplexen, die die Bindung der Transkriptionsfaktoren oder des Holoenzymkomplexes an die im Chromatin verpackte DNA ermöglichen. Mehrere Genaktivatoren können auch bezüglich eines Gens synergistisch arbeiten und Komplexe mit Koaktivatoren bilden, die nicht direkt an Kontrollsequenzen

binden. Daneben existieren auch Genrepressoren, die die Transkription unterdrücken. Sie können einerseits die Genaktivatoren direkt hemmen oder die korrekte Formung des Initiationskomplexes stören. Im Gegensatz zu den Aktivatoren interagieren sie mit Histon-Desacetylasen und repressiven Chromatin-Umformungskomplexen und machen damit die Promotorregion unzugänglich. Die Aktivität von Genaktivatoren und -repressoren wird durch äußere Signale wie Ligandenbindung oder Phosphorylierung gesteuert. Allgemein bezeichnet man als positive Kontrolle, wenn die Bindung beziehungsweise Dissoziation des Aktivatorproteins gesteuert wird, und als negative Kontrolle, wenn das Repressorprotein beeinflusst wird ⁴¹.

Die posttranskriptionale Kontrolle reicht von der Transkriptionsabschwächung mit vorzeitiger Unterbrechung der Transkription über die Regulation der RNA-Prozessierung bis hin zum kontrollierten mRNA-Export und -Abbau. Einer der bedeutendsten Regulationsmechanismen ist das alternative Spleißen. Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Spleißmöglichkeiten. Es können beispielsweise Introns und Exons übersprungen werden. Durch eine Überlappung von Spleißstellen können sich Exons gegenseitig ausschließen und es existieren optionale Spleißstellen innerhalb von Exons beziehungsweise Introns. Wie so oft hängt die Auswahl und Erkennung einer Spleißstelle von der durch Mutationen entstandenen Abweichung von einer Konsensussequenz ab, so dass man starke und schwache Spleißstellen unterscheidet. Vor allem zwei Mechanismen tragen dazu bei ein unkontrolliertes Überspringen von Spleißstellen zu vermeiden. Dies ist zum einen die Markierung von Exon- und Intronbereichen mit SR-Proteinen und hnRNPs. Zum anderen sind einige Spleißosomkomponenten mit der RNA-Polymerase assoziiert und setzen so zuerst an neu synthetisierte 5'-Spleißstellen und dann an die folgende 3'-Spleißstelle an, die sie erkennen. Können allerdings zwei oder mehrere 3'-Spleißstellen nicht genau voneinander unterschieden werden, kommt es zur zufälligen Auswahl einer Spleißstelle und dadurch zum konstitutiven alternativen Spleißen. Das bedeutet, dass zwei oder mehr Versionen des entsprechenden Proteins in allen Zellen synthetisiert werden. In vielen Fällen

lässt sich jedoch auch das alternative Spleißen regulieren, indem entweder Aktivatoren an gewisse Spleißstellen binden und den Spleißvorgang hier unterstützen (positive Kontrolle), oder Repressoren über entsprechende Bindungen die Spleißstelle blockieren (negative Kontrolle). Auch die Termination der Transkription kann kontrolliert werden, indem durch ein äußeres Signal bedingt die Konzentration von Spaltungsfaktoren steigt und eine alternative, bislang suboptimale Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle gewählt wird. Ein weiterer Regulationsmechanismus, der zur Expression unterschiedlicher Isoformen führen kann, ist das *mRNA-Editing*, bei dem einzelne Basen nachträglich ausgetauscht werden. Die reife mRNA ist zudem der schrittweisen Verkürzung des poly-A-Schwanzes durch 3' – 5'-Exonukleasen mit anschließendem *Decapping* am 5'-Ende und schnellem 5' – 3'-Abbau ausgesetzt. Alternativ kann der poly-A-Schwanz auch als ganzes durch eine Endonuklease abgetrennt werden. Beide Abbauvorgänge können durch Regulatorproteine, die am 3'-Ende binden beschleunigt oder gebremst werden ⁴¹.

1.2.2 Translation

In der Nukleotidsequenz der zytosolischen mRNA ist die Information für die Proteinbiosynthese festgelegt. Drei aufeinander folgende Nukleotide bilden ein Codon, welches einer bestimmten Aminosäure (AS) zugeordnet werden kann oder als Stopp-Codon das Ende der Translation markiert. Die entsprechenden Aminosäuren werden durch spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetasen an das 3'-Ende derjenigen tRNAs gebunden, die eine komplementäre Anticodon-Sequenz aufweisen. Die Translation findet in den Ribosomen statt, die aus verschiedenen rRNAs und Proteinen aufgebaut sind und zwei Untereinheiten bilden. An die kleine ribosomale Untereinheit, die unter anderem die Bindungsstelle für die mRNA enthält, binden zuerst die Initiator-tRNA, an die die Aminosäure Methionin gekoppelt ist, und mehrere eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs). Andere eIFs binden an das 5'-*Cap*-Ende und den poly-A-Schwanz der mRNA. Die kleine ribosomale Untereinheit setzt dann an das 5'-Ende der mRNA an und fährt diese mit Hilfe zusätzlicher Initiationsfaktoren mit Helikaseaktivität ab, bis sie auf das Start-Codon AUG trifft, an dass die

Initiator-tRNA binden kann. Mit der Bindung der Initiator-tRNA lösen sich die eIFs ab und geben den Weg frei für die Bindung der großen ribosomalen Untereinheit, die die Bindungsstellen für die tRNAs und die Peptidyltransferase enthält. Neben der Initiator-tRNA setzt eine zweite AS-gekoppelte tRNA entsprechend dem in der Bindungsstelle vorliegenden Codon an. Die Peptidyltransferase transferiert die Start-AS Methionin auf die neue Aminosäure und die beiden gebundenen tRNAs verschieben sich um eine Bindungsstelle, während das Ribosom auf der mRNA vorrückt. Dabei löst sich die freie Initiator-tRNA, während die AS-Kette auf der zweiten tRNA gebunden bleibt und die benachbarte Bindungsstelle nun für die nächste Aminoacyl-tRNA bereitsteht. Nach diesem Prinzip wird die Elongation der Peptidkette am Carboxylende fortgesetzt. An diesem Vorgang sind zwei Elongationsfaktoren beteiligt, die durch Konformationsänderung und GTP-Hydrolyse zum einen die korrekte Codon-Anticodon-Paarung und zum anderen die Translokation zweier gebundener tRNAs um eine Bindungsstelle erleichtern. Die Translation wird beendet, wenn eines der Stopp-Codons UAA, UAG oder UGA in die freie Bindungsstelle tritt und hier den Freisetzungsfaktor bindet. Der Sequenzbereich zwischen Start- und Stopp-Codon wird als offener Leserahmen (ORF) bezeichnet. Die Translation läuft für alle Proteine prinzipiell gleich im Zytosol ab. Bei Proteinen, die jedoch in andere Zellkompartimente geleitet werden sollen, wird die Adressierung über synthetisierte Signalsequenzen gesteuert, die von spezifischen Bindeproteinen erkannt werden können. Außerdem beginnt meist schon während der Translation die Faltung der neu synthetisierten Proteine in ihre dreidimensionale Struktur teilweise unter der Katalyse verschiedener Enzyme wie der Chaperone⁴¹. Ihre endgültige Funktionsfähigkeit erreichen die Proteine oft erst nach einer posttranslationalen Modifikation.

1.2.2.1 Translationale Kontrolle und posttranslationale Modifikation

Analog zur Transkription bietet auch die Initiation der Translation mehrere Kontrollmöglichkeiten. In der Umgebung des Start-Codons, welches von der Initiator-tRNA gebunden werden soll, gibt es Konsensussequenzen, die vom Initiationskomplex erkannt werden. Abweichungen der Erkennungsbereiche von

dieser Sequenz können dazu führen, dass das betroffene, schwache Start-Codon übersprungen wird und die Translation erst an der folgenden AUG-Sequenz beginnt. Es existieren Translationsrepressoren, die an das 5'-Cap-Ende oder den Poly-A-Schwanz binden können und so das Zusammenlagern der kleinen ribosomalen Untereinheit und der Initiationsfaktoren hemmen. Interne Ribosomeintrittsstellen (IRES) sind mRNA-Sequenzen, die selektiv aktiviert werden, bestimmte Initiationsfaktoren binden und somit den Initiationsansatz vom 5'-Cap-Ende an die Stelle des IRES verlegen können. In anderen Fällen sind dem ersten AUG-Codon der eigentlich zu translatierenden Sequenz ein oder mehrere kurze ORFs vorgelagert. Beim Anlagern des Initiationskomplexes am 5'-Ende werden eben diese ORFs translatiert und das Ribosom springt vor Erreichen des eigentlichen Start-Codons von der mRNA ab, wenn dieser Vorgang nicht von Regulatorproteinen unterbunden wird. Eines der bedeutendsten Regulationsmechanismen ist die Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2, welcher in der unphosphorylierten, GTP-aktivierten Form die Bindung der beladenen Initiator-tRNA an die kleine ribosomale Untereinheit vermittelt. Als Antwort auf äußere Signale wird das inaktive eIF2 phosphoryliert und kann sein GDP nicht mehr gegen GTP austauschen, wodurch es inaktiv bleibt ⁴¹. Abbausignale in Form bestimmter Aminosäuresequenzen oder Konformationsmuster liegen bei fehlerhaft synthetisierten Proteinen frei oder werden durch äußere Signalwirkung auf zelluläre Proteine freigelegt. Die Abbausignale werden durch mehrere Ubiquitinmoleküle markiert und das so markierte Protein dem Proteasom zum Abbau zugeführt.

Unter der posttranslationalen Modifikation versteht man proteolytische und chemische Veränderungen des neu synthetisierten Proteins, die oftmals erst die biologische Aktivität des Proteins ausmachen. So können beispielsweise aus großen Vorläuferpeptiden mittels spezifischer Proteasen ein oder mehrere Proteine ausgeschnitten und Signalpeptide abgetrennt werden. Typische chemische Modifikationen sind die Acetylierung der N'-terminalen Aminosäure, die vor dem Abbau durch Proteasen schützt, die Glykosylierung der Seitenketten von Asparagin, Hydroxylysin, Hydroxyprolin, Serin und Threonin, die

Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin sowie das Anfügen hydrophober Schwänze. Diese Prozesse dienen beispielsweise der Ausbildung der korrekten Proteinkonformation, der Integration von Membranproteinen oder Zellinteraktion der extrazellulären Matrix^{41 - 42}.

1.3 Das differentiell exprimierte Gen p306

1.3.1 Vorarbeiten

Ein Interessenschwerpunkt der Arbeitsgruppe Brossart ist die Erforschung von dendritischen Zellen und ihrer Rolle im Immunsystem. Zu diesem Zweck wurden Gene bestimmt, die nur in *Monocyte-derived Dendritic Cells* (mDC) und nicht in den Monozyten, aus denen sie generiert worden waren, exprimiert wurden. Solche differentiell exprimierten Gene wurden mit Hilfe des *BD Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits* ausselektiert. Bei diesem Verfahren wurden zunächst kurze cDNA-Fragmente aus mDC, so genannte *tester* cDNA, in zwei Proben aufgeteilt und mit jeweils anderen Adaptermolekülen verbunden, die die Bindungsstellen für Primer trugen. Die beiden *tester* cDNA-Proben wurden anschließend mit einer Probe von cDNA-Fragmenten aus Monozyten, der *driver* cDNA getrennt hybridisiert, so dass übereinstimmende cDNA-Sequenzen aneinander binden konnten, während differentiell exprimierte Sequenzen ungepaart blieben. In einem zweiten Schritt wurden beide Ansätze vereinigt und ungepaarte differentiell exprimierte Sequenzen konnten nun ebenfalls hybridisieren. Während der anschließenden PCR wurden allerdings nur die differentiell exprimierten cDNA-Sequenzen der mDC amplifiziert, da sie zwei verschiedene Adaptermoleküle und damit die passenden Bindungsstellen für die eingesetzten Primer trugen. Die so isolierten, kurzen differentiell exprimierten Sequenzen (*expressed sequence tag*; EST) wurden in einen Vektor transferiert, in *E. coli* kloniert und anschließend sequenziert (*4 Base Lab*, Reutlingen, Deutschland). Mit Hilfe der NCBI BLAST Algorithmen (*National Center of Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool*) wurden die ESTs mit bekannten cDNA-Sequenzen in cDNA-Bibliotheken abgeglichen⁴³. Eine der isolierten Sequenzen zeigte einhundertprozentige Übereinstimmung mit den beiden bereits bekannten

cDNA-Sequenzen AK058145 (NCBI *Accession*-Nummer) und NM_145018 (NCBI *Accession*-Nummer). Die Suche mit NCBI BLAST nach diesen beiden Sequenzen in genomischen DNA-Bibliotheken ergab, dass AK058145 (cDNA I; 1830 bp) und NM_145018 (cDNA II; 3545 bp) wahrscheinlich auf zwei Spleißvarianten desselben Gens zurückzuführen waren, welches sich auf den humanen Chromosomen 10 [Locus AC022399 (NCBI *Accession*-Nummer)] und 11 [Locus AC080106 und Locus AP000893 (NCBI *Accession*-Nummer)] fand. Wir nannten dieses Gen p306. Ein entsprechendes Model des alternativen Spleißens ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

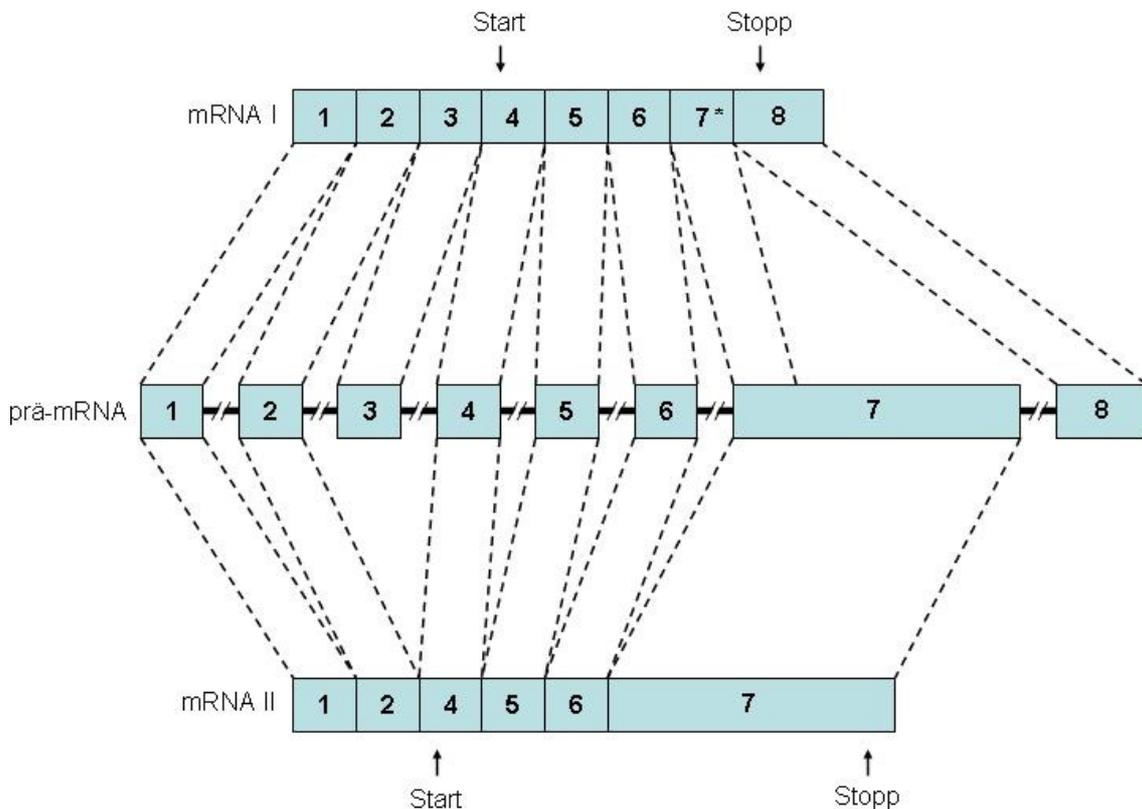


Abbildung 1: Model des alternativen Spleißens des Gens p306.

Die nummerierten Boxen entsprechen den Exons 1 - 8. Die Basenpaarangaben der Exonbereiche beziehen sich auf den Genlocus AC022399 auf Chromosom 10 (NCBI BLAST *Accession*). Exon 1 (47832 - 47957 bp), Exon 2 (59422 - 59520 bp), Exon 3 (60091 - 60304 bp), Exon 4 (60857 - 60987 bp), Exon 5 (74913 - 75075 bp), Exon 6 (76294 - 76408 bp), Exon 7 (77866 - 80789 bp), Exon 8 (103549 - 104412 bp). Das Exon 7 enthält eine interne Spleißstelle, die den Exonabschnitt 7* (77866 - 77983 bp)

abgrenzt. Die Spleißvariante mRNA I entspricht der cDNA I -Sequenz und setzt sich aus den Exons 1 - 6, dem Exonabschnitt 7* und Exon 8 zusammen. Die Spleißvariante mRNA II entspricht der cDNA II -Sequenz und setzt sich aus den Exons 1, 2 und 4 - 7 zusammen. Die Positionen der Start- und Stopp-Codons, die die jeweils längsten offenen Leserahmen (ORF) markieren, sind ebenfalls eingetragen. Für die mRNA I ergibt sich somit ein ORF von 456 bp und für die mRNA II ein ORF von 2997 bp.

In beiden mRNA-Sequenzen wurde der längste offene Leserahmen (ORF) bestimmt und die entsprechenden Aminosäuresequenzen abgeleitet. Das vom Gen p306 exprimierte hypothetische Protein nannten wir P306, die der cDNA I (AK058145) entsprechende Proteinisoform P306a und die der cDNA II (NM_145018) entsprechende Isoform P306b. Die Berechnung der Molekulargewichte der Isoformen ergab für P306a etwa 20 kDa und für P306b etwa 110 kDa. In Einklang mit unserem Model vom alternativen Spleißen stimmten beide Isoformen des hypothetischen Proteins, wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist, in ihren Anfangsbereichen überein.

P306a

MNRRRKFLLASVLALQNSSFIYPSCQKCFSRII
 LVSKRSNCPKCGSTGESGNANYRYKLSLKVA
 ESNKLFVITVFGSCLDTFFGLTATGLHRYIQDP
 NKIPETLDNDTTQNLTKAVETCFVGGQSFIFGV
 TNFENQPGQGSASNFLQCCSDRKRKAKAL
 VACQIVLPDPATQDAKTK

P306b

MNRRRKFLLASVLALQNSSFIYPSCQKCFSRII
 LVSKRSNCPKCGSTGESGNANYRYKLSLKVA
 ESNKLFVITVFGSCLDTFFGLTATGLHRYIQDP
 NKIPETLDNDTTQNLTKAVETCFVGGQSFIFGV
 TNFENQPGQGSASNFLQCCSDHKKRKAAL
 VACQIVLPDPGIAGFTVIDYFHQLLQTFNFRK
 LQCDSQAPNNHLLALDHSNSDLSSSTYTSDDSTS
 DFFKSCSKDTFSKFWQPSLEFTCIVSQLTDND
 DFSASEQSKAFGLTQQNRKSISIAEATGSSSC
 HDPIQDSWSLVSYMDKKSTAEKLGKELGLQAK
 ELSAVHSSHHEIGVNDNLFSLEMREPLESSN
 TKSFHSAVEIKNRSQHELPCFQHHGIDTPTSLQ
 KRSACPPSLLRLEETASSSQDGDPPQIWDLLP
 FSESLNKFLAVLESEIAVTQADVSSRKHVVND
 DIDKFHADHSSLSVTPQRTTGALHTPPIALRSS
 QVIVKANCSKDDFLFNCKGNLSPSVEKESQPD
 NKVEAVSVNHNGRDMSEYFLPNPYLSALSSSS
 KDLETIVTLKKTIRISPHRESDHSSLNKNKYLNGC
 GEISVSEMNEKLTTLCYRKYNDVSDLCKLENK
 QYCRWSKNQDDSFITICRKLTYPLETLCNSPNR
 STNTLKEMPWGHINNNVTQSYSIGYEGSYDAS
 ADLFDIAKEMDIATEITKKSQDILLKWTSLAE
 SHPSEDFSLRSLSEDFIQPSQKLSLQSLSDSR
 HSRTCSPTPHFQSDSEYNFENSQDFVPCSQS
 TPISGFHQTRIHGINRAFKKPVFYSDLDGNYEKI
 RIFPENDKQQASPSCPKNIKTPSQKIRSPIVSGI
 SQPDVFNHYPPFAECHEHDSDEWVPPPTTKIFP
 SDMLGFQGGIGLGLKCLAAHYHFPDQQLPRKLLK
 HIRQGTNKGLIKKKLKNMLAAVVTKKTKHYNC
 KSSGWISKCPDIQVLAAPQLHPILGPDSCSEVK
 CCLPFSEKGPSPVCETRSAWSPELFS

Abbildung 2: Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code.

Die fett gedruckten Sequenzen markieren den Anfangsbereich, in dem beide Isoformen P306a (20 kDa) und P306b (110 kDa) übereinstimmen.

Für unsere Experimente ließen wir einen polyklonalen Antikörper und verschiedene spezifische Primer herstellen. An Hand der bei Pineda – Antikörper-Service, Berlin durchgeführten Epitopenanalyse des gemeinsamen Abschnitts beider Proteinisoformen wurde die Aminosäuresequenz „CDSTGESGNANYRY“ als geeignetes Immunisierungspeptid ausgewählt und dieses in Kaninchen injiziert, um einen polyklonalen *Rabbit* Anti-P306 Antikörper herzustellen. Aus dem Immunserum wurde schließlich die monospezifische IgG-Fraktion mittels Affinitätschromatographie isoliert. Die Primer wurden von BioTeZ Berlin-Buch GmbH nach unseren Vorgaben hergestellt. Die jeweiligen Oligo-Nukleotidsequenzen, Kurzbezeichnungen und Vorkommen der Bindungsstellen in den beiden cDNA-Sequenzen AK058145 (cDNA I) und NM_145018 (cDNA II) sind in der folgenden Tabelle zusammen-

gefasst. Die Positionen der Bindungsstellen innerhalb der cDNA-Sequenzen sind in einem Model in Abb. 15 (Seite 72) eingetragen.

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen und Bindungsstellen der Primer

Nukleotidsequenz der Primer In 5' – 3'-Richtung	Kurzbezeichnung der Primer	Vorkommen auf	
		cDNA I	cDNA II
AAACTCCCTACCTCAGACCA	F0	Ja	Nein
CTCACTATGGCCTTGATCCT	F1	Ja	Ja
ACTGGTGAATCTGGAAATGC	F2	Ja	Ja
AATGTGGCTCTACTGGTGAA	F3	Ja	Ja
GATCCTGAATGTACCTGTGC	R0	Ja	Ja
GGCATTTCAGATTACCAG	R1	Ja	Ja
AAGTGAGTGAGTCCCTTTG	R2	Ja	Nein
CACTCAGCTCCTTAGCTTGT	R3	Nein	Ja

1.3.2 Zielsetzung

Die Aufgabe dieser Doktorarbeit war es zunächst die differentielle Expression des Gens p306 in aus Monozyten generierten dendritischen Zellen auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot nachzuweisen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Primer sollte die Modelvorstellung vom alternativen Spleißen überprüft werden. Ebenso musste untersucht werden, ob und wie die beiden auf das alternative Spleißen zurückzuführenden Proteinisoformen in dendritischen Zellen exprimiert würden. Die Charakterisierung der differentiellen Genexpression sollte durch Untersuchungen zur Kinetik und der Regulierbarkeit durch potentielle Stimulatoren und Inhibitoren ergänzt werden. Abschließend sollte ermittelt werden, ob das Gen p306 auch in aus hämatopoetischen Vorläuferzellen generierten dendritischen Zellen, Makrophagen, Lymphozyten und vor allem in dendritischen Zellen aus peripherem Blut exprimiert würde. Im letzteren Fall sollten Unterschiede in der Expression zwischen Subpopulationen der dendritischen Zellen untersucht werden. Die genaue Charakterisierung der differentiellen Genexpression von

p306 ist Voraussetzung für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung des bis dato unbeschriebenen Gens.

2 Material

2.1 Geräte

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Geräte und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2: Geräte

Produkt	Hersteller
<i>Cycler Gene Amp PCR System 9600</i>	<i>Perkin Elmer Life Science, Wellesley, USA</i>
<i>UV-Reader Biometra Bio Doc Analyzer</i>	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	<i>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</i>
Elektrophorese-Apparaturen: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Mini-Protean 3 Electrophoresis System</i> • <i>GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus</i> 	<i>BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland</i> Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
<i>Electrophoresis Power Supply EPS 601</i>	<i>General Electrics Healthcare GmbH, Freiburg, Deutschland</i>
Heiz- und Magnetrührer <i>RCT basic IKA®</i>	<i>VWR International GmbH Bruchsal, Deutschland</i>
Heizblock für 1,5 ml Reaktionsgefäße: Unitek HBS-130	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Schwenktisch Polymax 1040	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland</i>
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

<i>Mini Trans Blot Cell</i>	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<i>Magnetic cell separators:</i> <ul style="list-style-type: none"> • MidiMACS • VarioMACS 	<i>Miltenyi Biotec</i> GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Neubauerkammer	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
<i>Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II</i>	<i>General Electrics Healthcare</i> GmbH, Freiburg, Deutschland
<i>Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow</i>	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Sterilbank <i>Kendro Lamin Air</i> HLB 2472 GS	<i>Kendro Laboratory Products</i> GmbH, Langenselbold, Deutschland
<i>MS2 Minishaker</i>	<i>IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA</i>
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zellkultur-Brutschrank	<i>NuAire, Inc., Plymouth, USA</i>
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> • Kendro Megafuge 1.0 R • Kendro Megafuge 3.0 R • Eppendorf Zentrifuge 5417R 	<i>Kendro Laboratory Products</i> GmbH, Langenselbold, Deutschland <i>Kendro Laboratory Products</i> GmbH, Langenselbold, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterial

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Pipetten:	
10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
20 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2 ml, Polystyrol, steril, gestopft	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
5 ml, Polystyrol, steril, gestopft	<i>Corning Inc., Corning, NY, USA</i>
10 ml, Polystyrol, steril, gestopft	<i>Corning Inc., Corning, NY, USA</i>
25 ml, Polystyrol, steril, gestopft	<i>Corning Inc., Corning, NY, USA</i>
50 ml, Polystyrol, steril, gestopft	<i>Corning Inc., Corning, NY, USA</i>
Pipettenspitzen ungestopft	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
200 µl	
1000 µl	
Pipettenspitzen gestopft	<i>Biozym Scientific GmbH</i> , Oldendorf, Deutschland
10 µl	
20 µl	
200 µl	
1000 µl	
Polypropylenröhrchen Falcon [®] , 50 ml	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland
<i>PP-Test Tube Cellstar[®]</i> , steril, 15 ml	<i>Greiner Bio-One GmbH</i> , Frickenhausen, Deutschland
<i>Falcon[®] Tissue Culture Flask</i>	<i>BD Biosciences</i> , Heidelberg, Deutschland

0.2 µm Vented Blue Plug Seal Cap, 250 ml, 75 cm ²	
NUNC Cryo Tube™ Vials 1,0 ml	<i>Nalge Nunc International, Rochester, USA</i>
Einweg-Pasteurpipetten 3 ml	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Microtubes, 0,2 ml (PCR-Softstrips)	<i>Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland</i>
<i>Cellstar® Tissue Culture Plate, 96W, flat bottom, with lid</i>	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</i>
<i>Falcon® Tissue Culture Plate, Multiwell™, 6 Well, flat bottom with lid</i>	<i>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube 12 x 75 mm style</i>	<i>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</i>
Whatman-Papier	<i>BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland</i>
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioSciences GmbH, Dassel, Deutschland
Zellschaber <i>Cell Lifter</i>	<i>Corning Inc., Corning, NY, USA</i>
MACS-Säulen: <ul style="list-style-type: none"> • <i>MACS Column LS</i> • <i>MACS Column CS</i> 	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>

2.3 Reagenzien

Verwendete Reagenzien, die hier nicht aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland bezogen.

2.3.1 Antikörper

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Antikörper und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 4: Antikörper

Produkt	Hersteller
<i>Rabbit</i> Anti-P306 AK (polyklonal)	Pineda-Antikörper Service, Berlin, Deutschland
<i>Goat Anti-Rabbit</i> HRP-conjugated IgG	<i>Santa Cruz Biotechnology Inc.</i> , Heidelberg, Deutschland
<i>Mouse Anti-Rabbit</i> GAPDH IgG	<i>HyTest Ltd.</i> , Turku, Finland
<i>Goat Anti-Mouse</i> HRP-conjugated IgG	<i>Santa Cruz Biotechnology Inc.</i> , Heidelberg, Deutschland
<i>Mouse</i> Anti-CD1a FITC	<i>BD Biosciences Pharmingen</i> , San Diego, USA
<i>Mouse</i> Anti-CD3 FITC	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA
<i>Mouse</i> Anti-CD14 FITC	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA
<i>Mouse</i> Anti-CD19 FITC	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA
<i>Mouse</i> Anti-CD20 FITC	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA
<i>Mouse</i> Anti-CD86 FITC	<i>BD Biosciences Pharmingen</i> , San Diego, USA
<i>Mouse</i> Anti-HLA-DR FITC	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA
<i>Mouse</i> Anti-BDCA-2 FITC	<i>Miltenyi Biotec GmbH</i> , Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mouse</i> Anti-Biotin FITC	<i>Miltenyi Biotec GmbH</i> , Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Mouse</i> IgG1 FITC	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA
<i>Mouse</i> Anti-CD3 PE	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA

<i>Mouse Anti-CD11b PE</i>	<i>DakoCytomation, Glostrup, Dänemark</i>
<i>Mouse Anti-CD14 PE</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Mouse Anti-CD19 PE</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Mouse Anti CD56 PE</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Mouse Anti-CD80 PE</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Mouse Anti-CD83 PE</i>	<i>Immunotech, Marseille, Frankreich</i>
<i>Mouse Anti-CD123 PE</i>	<i>BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA</i>
<i>Mouse Anti-HLA-DR PE</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Mouse Anti-TCR α/β PE</i>	<i>BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA</i>
<i>Mouse IgG1 PE</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Mouse Anti-CD 19 PerCP</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Anti-CD3 MicroBeads</i>	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
<i>Anti-CD19 MicroBeads</i>	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
<i>Anti-CD14 MicroBeads</i>	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>

2.3.2 Chemikalien, Nukleotide und Peptide

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Chemikalien, Nukleotide und Peptide sowie Hersteller aufgeführt.

Tabelle 5: Chemikalien, Nukleotide und Peptide

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	<i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland</i>
Aprotinin (2 mg/ml)	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Ammoniumpersulfat	<i>Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland</i>

BSA	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
β -Mercaptoethanol	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
DTT	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA, 0,5M	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
FCS	Invitrogen Gibco TM , Karlsruhe, Deutschland
Ficoll: <i>Biocoll Separating Solution</i>	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Igepal CA-630	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
LPS (TLR-4-Ligand)	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pam ₃ Cys (TLR-2-Ligand)	<i>EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland</i>
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen Gibco TM , Karlsruhe, Deutschland
Imatinib (STI 571)	Imatinib wurde der AG Brossart von Elisabeth Buchdunger, <i>Novartis Pharmaceuticals</i> , Basel, Schweiz überlassen

Immunisierungspeptid von P306	Pineda-Antikörper <i>Service</i> , Berlin, Deutschland
PGE ₂	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
PMSF	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Poly I:C (TLR-3-Ligand)	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Primer, spezifisch für p306	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin, Deutschland
R-848 (TLR-7-Ligand)	<i>InvivoGen, San Diego, USA</i>
SDS	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Slim-Fast</i> [®] Schokolade	<i>Slim Fast</i> Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Streptavidin HRP Konjugat	<i>General Electrics Healthcare</i> GmbH, Freiburg, Deutschland
TEMED	<i>Serva Electrophoresis</i> GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Troglitazone (TGZ)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Trypanblau	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
Tween [®] 20 (Polyoxyethylensorbitan monolaurate)	<i>Sigma, St. Louis, USA</i>
<i>GeneRuler</i> [™] 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
<i>Bench Mark</i> [™] Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Biotinylated SDS PAGE Standards Low Range</i>	<i>BioRad Laboratories</i> GmbH, München, Deutschland

2.3.3 Kits

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Kits und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 6: Kits

Produkt	Hersteller
<i>MACS Blood Dendritic Cell Isolation Kit</i>	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
<i>MACS BDCA-4 Cell Isolation Kit</i>	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
<i>MACS CD1c (BDCA-1) Dendritic Cell Isolation Kit</i>	<i>Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
<i>BCA Protein Assay Reagent Kit</i>	<i>Pierce, Peribo Science, Bonn, Deutschland</i>
<i>ECL™ Western Blotting Detection Reagent Kit</i>	<i>General Electrics Healthcare GmbH, Freiburg, Deutschland</i>
<i>RNeasy Mini Kits</i>	<i>Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland</i>
<i>Superscript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR</i>	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Amplitaq PCR-Set</i>	<i>Perkin Elmer, Boston, USA</i>

2.3.4 Medien

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Medien und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 7: Medien

Produkt	Zusammensetzung	Hersteller
RPMI 1640 mit Glutamax-I	Mit L-Glutamin und 25mM HEPES	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
<i>Bio Whittaker™ X-Vivo 20</i>		<i>Cambrex Bio Science, Walkersville, USA</i>
RP10-Nährmedium	Medium RPMI 1640 mit	Alle verwendeten Pro-

	Glutamax-I, 10% hitzeinaktiviertes FCS (45 min bei 55 °C), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	dukte von Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
--	--	---

2.3.5 Zytokine

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Zytokine und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 8: Zytokine

Produkt	Hersteller
GM-CSF <i>Leukine® Liquid</i>	<i>Berlex® Laboratories Inc., Richmond, USA</i>
IL-4	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>
IL-10	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>
TNF α	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>
IFN γ	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>
FLT3-Ligand	<i>R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland</i>
CD40-Ligand	<i>Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich</i>

2.3.6 Puffer

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Puffer und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 9: Puffer

Produkt	Zusammensetzung
RIPA-Lysepuffer	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS 2 mM EDTA 2 µg/ml Aprotinin 1 mM PMSF in PBS
NP40-Lysepuffer	0,05 M HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 1% Igepal CA-630 2 mM EDTA 10% Glycerin 2 mg/ml Aprotinin 1 mM PMSF
FACS-Puffer	0,5% FCS in PBS
MACS-Puffer	0,5% FCS 2mM EDTA in PBS
DNA-Probenpuffer für Agarose-gelelektrophorese, 6-fach	0,15% Bromphenolblau 0,15% Xylencyanol 1mM EDTA pH 8,0 30% Glycerin in H ₂ O
Laufpuffer für SDS-PAGE	192 mM Glycin 25 mM Tris

	0,1% SDS
Transferpuffer für SDS-PAGE	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS 20% Methanol
Probenpuffer für SDS-PAGE, 3-fach	0,18 M Tris-HCl pH 6,8 28% Glycerin 0,001% Bromphenolblau 6% SDS
TBS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl
0,5% TBST	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 0,5% Tween-20
3% TBST	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 3% Tween-20
TAE	40 mM Tris, 13 mM Essigsäure pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0,

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Gewinnung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut mittels Adhärenz

Die PBMC wurden aus *buffy coats* gesunder Spender gewonnen, die von der Blutspendezentrale Tübingen geliefert wurden. Um die mononukleären Zellen von den übrigen Zellen im *buffy coat* zu trennen wurde eine Dichtezentrifugation mit Ficoll durchgeführt. Dazu wurde das Blut in einer Kulturflasche im Verhältnis

1:4 mit PBS verdünnt. In sechs 50 ml Polypropylenröhrchen wurden je 12 ml Ficoll vorgelegt und anschließend mit je 33 ml des verdünnten Bluts vorsichtig überschichtet. Die zweiphasigen Ansätze wurden in der Megafuge 3.0 R von Kendro bei 818 x g und Raumtemperatur für 18 min mit Beschleunigungsgradient 3 und Bremsgradient 3 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Plasmaüberstand bis auf 1 cm oberhalb der weißlichen Trennschicht aus mononukleären Zellen abgesaugt, die auf Grund ihrer Dichte auf dem Ficoll schwammen, während sich die übrigen Blutzellen am Boden des Röhrchens gesammelt hatten. Mit einer Pasteurpipette wurde selektiv diese Zellschicht aus PBMC abgesaugt und in zwei neue 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde daraufhin dreimal mit je 40 ml PBS und fünfminütiger Zentrifugation bei 404 x g (Megafuge 1.0 R) gewaschen und anschließend in einem gemeinsamen Röhrchen in 10 ml PBS aufgenommen. Bevor die isolierten PBMC entweder durch MACS weiter selektiert oder in Kultur genommen werden konnten, mussten sie zunächst ausgezählt werden.

3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Grundsätzlich wurde eine Probe einer Zellsuspension mit einer bestimmten Menge Trypanblau gefärbt und gegebenenfalls zusätzlich mit PBS verdünnt. 10 µl dieser angefärbten Suspension wurden in die Neubauerkammer überführt und alle ungefärbten, intakten Zellen in 16 quadratischen Feldern unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Hochrechnung auf die Gesamtzellzahl erfolgte nach folgender Formel:

Gezählte Anzahl x 10^4 x Verdünnungsfaktor x Gesamtvolumen = Gesamtzellzahl in Gesamtvolumen der Zellsuspension.

Im Falle der Gewinnung von PBMC aus *buffy coats* wurden in der Regel 2 µl der 10 ml Zellsuspension von isolierten PBMC mit 178 µl PBS und 20 µl Trypanblau verdünnt und angefärbt. Der Verdünnungsfaktor entsprach in dem Fall 100. Im Falle einer Selektion bestimmter Zellen durch MACS wurden hingegen weitaus geringere Zellzahlen isoliert, so dass eine 1:1 Verdünnung der jeweiligen Zellproben mit Trypanblau bei der Auszählung ausreichte.

3.1.3 Generierung von Monozyten mittels Adhärenz

Mit Hilfe der ermittelten Gesamtzellzahl von PBMC wurde nach erneuter Zentrifugation das *Pellet* in soviel X-Vivo 20 Medium gelöst, dass die Konzentration in etwa 10^8 Zellen pro 1 ml betrug. Anschließend wurde je 1 ml dieser Zellsuspension in mit je 9 ml X-Vivo 20 gefüllte 75 cm² –Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank zwei Stunden lang inkubiert. Während dieser Zeit adhärten die Monozyten am Boden der Kulturflasche, während die übrigen PBMC im Überstand gelöst blieben. Nach zweistündiger Inkubation der PBMC im Brutschrank und abgeschlossener Adhärenz der Monozyten konnten die Überstände abgesaugt und die adhärenen Monozyten zwei- bis dreimal mit PBS auf dem Schwenktisch gewaschen werden. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, dass keine anderen Zellen mehr im Überstand gelöst waren. Die adhärenen Monozyten standen danach zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

3.1.4 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Nach erfolgter Inkubation, Adhärenz und Waschen der Monozyten wurde der Überstand vollständig abgesaugt und die 75 cm² -Zellkulturflaschen mit den adhärenen Monozyten mit je 10 ml RP10-Medium bestückt. Um die Monozyten zu dendritischen Zellen (mDC) differenzieren zu lassen, wurden 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 je Flasche an den Tagen 0, 2, 4 und 6 der insgesamt siebentägigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ zugegeben. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die zellhaltigen Überstände aller Kulturflaschen in 50 ml Polypropylenröhrchen überführt, bei 404 x g fünf Minuten lang zentrifugiert und der Überstand im Röhrchen bis auf 1 cm oberhalb des Bodensatzes abgesaugt. Zellen die nach Abnahme des Überstands aus den Zellkulturflaschen noch am Boden haften geblieben waren, wurden durch mehrmaliges Waschen mit 10 ml PBS + 7 mM EDTA je Flasche auf dem Schwenktisch abgelöst. Die Suspensionen aus den Zellkulturflaschen wurden zu den übrigen Zellen in den 50 ml Polypropylenröhrchen zugegeben, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, dass möglichst alle Zellen aus den Kulturflaschen abgenommen

worden waren. Das *Pellet* aus dendritischen Zellen stand danach zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

3.1.5 Generierung von dendritischen Zellen aus CD34⁺ Vorläuferzellen

Mit G-CSF mobilisierte CD34⁺ Progenitorzellen wurden von der AG Möhle bezogen und je 5×10^5 Zellen in 3 ml RP10-Medium im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. An den Tagen 0, 2, 4, 6 und 8 wurden jeweils 20 ng/ml IL-4, 100 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml TNF α und 100 ng/ml FLT3-Ligand zugegeben und die differenzierten dendritischen Zellen (CD34 DC) am zehnten Tag nach dem in 3.1.4 beschriebenen Verfahren geerntet.

3.1.6 Generierung von makrophagenähnlichen Zellen

Nach erfolgter Inkubation, Adhärenz und Waschen der Monozyten, wie in 3.1.3 beschrieben, wurde der Überstand vollständig abgesaugt und die 75 cm² –Zellkulturflaschen mit den adhärennten Monozyten mit je 10 ml RP10-Medium bestückt. Anders als bei der Generierung von dendritischen Zellen wurden alle zwei Tage entweder nur 100 ng/ml GM-CSF oder überhaupt keine Zytokine zugegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am siebten Tag wurden die Zellen nach dem in 3.1.4 beschriebenen Verfahren geerntet.

3.2 Magnetic Associated Cell Sorting (MACS)

Die MACS Technologie behilft sich magnetischen *MicroBeads*, die an Antikörper gekoppelt sind, um bestimmte Zellpopulationen aus einem heterogenen Zellgemisch zu isolieren. Zellen, die mit den hochspezifischen monoklonalen MACS *MicroBeads* Antikörpern markiert wurden, werden beim Passieren der Matrix der MACS-Säulen im starken Magnetfeld des MACS Separators zurückgehalten und somit von den unmarkierten Zellen in mehreren Waschschritten getrennt. Nach Entfernen des Magnetfeldes können dann die markierten Zellen aus der Säule mit MACS-Puffer ausgewaschen werden. Der große Vorteil der MACS Technologie liegt darin, dass die Zielzellpopulationen in hoher Reinheit vorliegen und die Markierung mit *MicroBeads* Antikörpern in der

Regel keinen Einfluss auf FACS-Analysen oder molekularbiologische Experimente hat. Bei der Markierung der Zielzellen unterscheidet man eine direkte von einer indirekten Form. Bei der direkten Antikörpermarkierung werden Oberflächenantigene in nur einem Arbeitsschritt mit den jeweils spezifischen *MicroBeads* Antikörpern markiert. Liegen für einen bestimmten Oberflächenmarker keine spezifischen *MicroBeads* Antikörper vor, so wird bei der indirekten Markierung ein *MicroBead* Antikörper verwendet, der gegen den spezifischen, nicht-magnetische Erstantikörper gerichtet ist. Des Weiteren können grundsätzlich zwei unterschiedliche Verfahren der Zellselektion unterschieden werden. Bei der positiven Selektion werden die Zielzellen mit *MicroBeads* Antikörpern markiert und in der Säule zurückgehalten, während die restlichen, ungewollten Zellen ausgewaschen werden. Bei der Depletion hingegen werden die ungewollten Zellen magnetisch markiert und der Durchfluss mit den unmarkierten Zielzellen weiterverwendet. Es kommen auch Kombinationen dieser beiden Verfahren zum Einsatz, bei denen zum Beispiel eine positive Selektion im Anschluss an eine Depletion durchgeführt wird. Diese Kombination ist unter anderem dann erforderlich, wenn Oberflächenantigene der Zielzellen, die in der positiven Selektion markiert werden sollen, auch auf einigen ungewollten Zellpopulationen vorkommen.

3.2.1 Isolierung von Monozyten durch MACS

Als Alternative zur Generierung von Monozyten über Adhärenz wurden Monozyten auch durch MACS isoliert. Dazu wurden PBMC mit Anti-CD14 *MicroBeads* inkubiert und im MACS *Column LS* mit Hilfe des MidiMACS Separators positiv selektiert. Die Isolation erfolgte in allen Arbeitsschritten nach Angaben des Herstellers.

3.2.2 Isolierung von T-Lymphozyten durch MACS

T-Zellen wurden an Hand des spezifischen Oberflächenmarkers CD3 isoliert. Dazu wurden aus *buffy coats* gewonnene PBMC mit Anti-CD3 *MicroBeads* markiert und mit Hilfe eines MACS *Column LS* und eines MidiMACS Separators

positiv selektiert. Die Isolation erfolgte in allen Arbeitsschritten nach Angaben des Herstellers.

3.2.3 Isolierung von B-Lymphozyten durch MACS

CD19 ist ein spezifischer Oberflächenmarker der B-Zelllinie von den frühen Pro-B-Zellen bis zu den antigenabhängigen Lymphoblasten, der sich jedoch nicht mehr auf den ausdifferenzierten Plasmazellen findet. In dieser Arbeit wurden B-Zellen aus PBMC mit Hilfe von Anti-CD19 *MicroBeads*, eines MACS *Column LS* und eines MidiMACS Separators positiv selektiert. Die Isolation erfolgte in allen Arbeitsschritten nach Angaben des Herstellers.

3.2.4 Isolierung von *Blood Dendritic Cells* durch MACS

Dendritische Zellen des peripheren Bluts wurden in zwei Selektionsschritten von den übrigen PBMC, den T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen getrennt. Zunächst wurden die PBMC mit *FcR Blocking Reagent* aus humanem IgG und einem Cocktail aus Hapten-konjugierten Antikörpern gegen CD3, CD11b und CD16 inkubiert und danach indirekt mit Anti-Hapten *MicroBeads* markiert. In einem ersten Depletionsschritt wurden die so markierten T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen im MACS *Column CS* mit Hilfe des VarioMACS Separators von den übrigen PBMC getrennt. Der Durchfluss mit den verbliebenen PBMC wurde daraufhin mit Anti-CD4 *MicroBeads* inkubiert und die *Blood DC* durch positive Selektion im MACS *Column LS* und MidiMACS Separator von den restlichen ungewollten Zellen wie den B-Zellen getrennt. Die Isolation erfolgte in allen Arbeitsschritten nach Angaben des Herstellers.

3.2.5 Isolierung von plasmazytoiden (lymphatischen) dendritischen Zellen durch MACS

Plasmazytoide (lymphatische) dendritische Zellen exprimieren unter anderem die spezifischen Oberflächenmarker BDCA-2 und BDCA-4. Um die plasmazytoiden (lymphatischen) dendritischen Zellen aus den PBMC zu

isolieren, wurde das *BDCA-4 Cell Isolation Kit* verwendet. Dabei wurden die PBMC mit Anti-BDCA-4 *MicroBeads* und *FcR Blocking Reagent* aus humanem IgG inkubiert und im MACS *Column LS* mit Hilfe des MidiMACS Separators selektiert. Nach Entfernen des Magnetfeldes, wurden die positiv selektierten BDCA-4⁺ Zellen ausgewaschen und der Durchfluss erneut über eine MACS-Säule im MidiMACS Separator gegeben, um die Reinheit der Zielzellpopulation zu erhöhen. Die Isolation erfolgte in allen Arbeitsschritten nach Angaben des Herstellers.

3.2.6 Isolierung von CD1c (BDCA-1)⁺ myeloide dendritische Zellen durch MACS

Eine große Subpopulation an myeloiden dendritischen Zellen exprimiert das Antigen CD1c (BDCA-1). Da CD1c auch auf einer Subpopulation von B-Lymphozyten vorkommt, enthält das *CD1c (BDCA-1) Dendritic Cell Isolation Kit* auch Anti-CD19 *MicroBeads*. In einem ersten Depletionsschritt wurden deshalb PBMC mit Anti-CD19 *MicroBeads*, biotinylierten Anti-BDCA-1 Antikörpern und *FcR Blocking Reagent* inkubiert und die B-Zellen im MACS *Column CS* mit Hilfe des VarioMACS Separators ausselektiert. Der Durchfluss wurde anschließend mit Anti-Biotin *MicroBeads* markiert und die CD1c (BDCA-1)⁺ dendritischen Zellen im MACS *Column LS* mit Hilfe des MidiMACS Separators positiv selektiert. Die Isolation erfolgte in allen Arbeitsschritten nach Angaben des Herstellers.

3.3 Durchflusszytometrie

Bei der Laser-Durchflusszytometrie wird eine verdünnte Zellsuspension derartig durch eine dünne Kanüle im FACS-Gerät geleitet, dass die Zellen einzeln nacheinander die Foki mehrerer Laserstrahlen passieren. Dabei wird die von jeder Zelle ausgehende Lichtstreuung in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung gemessen. Die vorwärts gerichtete Lichtstreuung (*Forward scatter*) ist dabei ein Maß für die Zellgröße, während die seitlich gerichtete Streuung (*Side scatter*) ein Maß für die zelluläre Granularität darstellt. Werden die Zellen mit Antikörpern markiert, die ihrerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert

sind, kann zusätzlich die von Laserstrahlen induzierte Fluoreszenzstärke gemessen werden. Somit lassen sich Zellpopulationen bezüglich Zellgröße, Zellstruktur und Oberflächenmarkern analysieren. In dieser Arbeit wurden die Resultate der FACS-Analyse als Punkte in einem zweiachsigen Diagramm gemäß relativer Intensität der Lichtstreuung bzw. der Fluoreszenz dargestellt. Die FACS-Analyse diente dabei vor allem der Phänotypisierung und Reinheitskontrolle der in Zellkulturen oder durch Isolation mit MACS generierten Zellen.

Die spezifischen Oberflächenantigene der verschiedenen Zielzellen wurden mit Hilfe von FITC-, PE- und PerCP-konjugierten spezifischen FACS-Antikörpern markiert. Je Ansatz in einem 5 ml FACS-Röhrchen mit Rundboden wurden $0,5 - 1 \times 10^5$ Zellen verwendet. Die Anzahl an benötigten Ansätzen hing vom *Panel* ab, welches für die jeweiligen Zielzellen verwendet wurde. Eine entsprechende Gesamtzahl an Zellen wurde in einem FACS-Röhrchen zweimal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und das *Pellet* anschließend in einem Gesamtvolumen von 100 μ l FACS-Puffer je Ansatz gelöst. Um freie Fc-Rezeptoren abzusättigen und um falsch-positiven Bindungen bei der Inkubation mit den FACS-Antikörpern vorzubeugen, wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur mit 20 μ l Mouse IgG1 inkubiert. Die spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten FACS-Antikörper wurden in den jeweiligen Ansätzen vorgelegt und mit 100 μ l Zellsuspension je Ansatz bei 4°C - 8°C für 30 min abgedeckt inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden nach der Inkubation mit 1 ml FACS-Puffer ausgewaschen und das *Pellet* in 300 μ l FACS-Puffer je Ansatz suspendiert. Messung und Auswertung wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur und dem Programm *CellQuestTM Pro* (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die für die jeweiligen Zielzellen verwendeten *Panels* an Ansätzen und FACS-Antikörpern sind im Ergebnisteil aufgeführt.

3.4 Herstellung des Proteinlysats

3.4.1 Proteinlysate von adhärenen Monozyten

Für die Zellyse wurde 1 ml RIPA-Lysepuffer auf Eis gekühlt mit 10 µl Aprotinin (2 mg/ml) und 10 µl 100 mM PMSF vermischt. Die 75 cm²- Zellkulturflaschen mit den adhärenen Monozyten wurde ebenfalls nach Waschen und Absaugen des Überstands auf Eis gelegt. Dann wurden 300 - 500 µl Lysepuffer (als Richtwert galt 1 ml Lysepuffer auf 5×10^7 Zellen) in die Kulturflasche gegeben und die lysierten Monozyten mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Das gewonnene Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt und mit der Pipette mehrmals gut vermischt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat erneut durchmischt und in der Eppendorf-Zentrifuge mit 20000 x g bei 4°C 15 - 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein *Cryo tube* überführt und eine Probe für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Das Proteinlysate konnte entweder direkt weiterverwendet, oder bei -80°C aufbewahrt werden.

3.4.2 Proteinlysate von Zellen in Suspension

Jegliche Formen von dendritischen Zellen, Makrophagen, Lymphozyten und MACS-isolierten Monozyten lagen nach den bisher beschriebenen Verfahren isoliert in Zellsuspensionen vor. Für die Zellyse von 5×10^7 Zellen wurde 1 ml eisgekühlter RIPA-Lysepuffer mit 10 µl Aprotinin (2 mg/ml) und 10 µl 100 mM PMSF benötigt. Die jeweilige Zellsuspension wurde bei 404 x g 5 min lang zentrifugiert und das *Pellet* mit der entsprechenden Menge Lysepuffer auf Eis lysiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat erneut durchmischt und in der Eppendorf-Zentrifuge mit 20000 x g bei 4°C 15 - 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in *Cryo tubes* überführt und eine Probe für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Das Proteinlysate konnte entweder direkt weiterverwendet, oder bei -80°C aufbewahrt werden.

3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent Kit* bestimmt. Die bei der Herstellung der jeweiligen Proteinlysate entnommenen Proben wurden dazu in der Regel im Verhältnis 1:5 mit RIPA-Lysepuffer verdünnt und zusammen mit den BSA-Standardproteinlösungen auf eine 96 Loch-Gewebeplatte gegeben. Dabei wurden je 10 µl einer Proteinlösung in zwei nebeneinander liegenden Wells zwecks Doppelbestimmung gefüllt. Die Standardlösungen wurden in die oberste Zeile der 96 Loch-Gewebeplatte in absteigender Konzentration aufgetragen und dienten der Kalibrierung. Sie lagen in den Konzentrationen 2 ml/mg, 1,5 ml/mg, 0,75 ml/mg, 0,38 ml/mg, 0,18 ml/mg und 0,09 ml/mg vor und waren im Gegensatz zu den Proteinlysaten der Proben mit NP40-Lysepuffer verdünnt. Deshalb mussten für eine spätere Korrekturrechnung auch Proben von RIPA- und NP40-Lysepuffer auf die 96 Loch-Gewebeplatte aufgetragen werden. Die Reagenzien A und B des Kits wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und je 200 µl dieser Reagenzlösung in die *Wells* mit vorgelegten Proteinlösungen gegeben werden. Die 96 Loch-Gewebeplatte wurde abgedeckt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionswerte im *ELISA-Reader* gemessen und mit dem Programm *Easy-Fit* von SLT ausgewertet. Dabei wurde der jeweilige Mittelwert der Doppelbestimmungen ermittelt und bei den Probenlösungen mit dem Verdünnungsfaktor 5 multipliziert. Zusätzlich musste bei den Probenlösungen der Unterschied zwischen den Extinktionswerten von RIPA-Lysepuffer und Nullwert-Puffer NP40 addiert werden.

3.6 Proteinauftrennung durch Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung komplexer Proteingemische nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine. Bei der Präparation der Proteinproben überdeckt das anionische Detergenz SDS die Eigenladungen der Proteine, während das reduzierende DTT durch Spaltung von Disulfidbrücken die Quartärstruktur aufhebt und das Aufkochen die Tertiär- und Sekundärstruktur zerstört. Dadurch wird gewährleistet, dass die einzelnen Proteine nur ihrer Größe und molaren Masse nach aufgetrennt werden, wobei sich die

Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel umgekehrt proportional zum Molekulargewicht verhält. Die bei dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele setzten sich aus einem weitporigen Sammelgel, in dem die Proteinproben fokussiert wurden, und einem engporigen zwölfprozentigen Trenngel zusammen. Die Ansätze für die jeweiligen Gele wurden wie folgt hergestellt.

Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel in der SDS-PAGE

12% Trenngel		Sammelgel	
ddH ₂ O	3,2 ml	ddH ₂ O	3 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8	5,6 ml	2 M Tris/HCl pH 6,7	1 ml
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	6 ml	30 % Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	1 ml
10% SDS	150 µl	10% SDS	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl
APS	100 µl	APS	50 µl

Nach Zugabe von TEMED und APS setzte die Polymerisation der Gele sehr schnell ein und so wurden diese Katalysatoren erst kurz vor dem Gießen der Gele eingesetzt. Zuerst wurde das Trenngel in der Gußvorrichtung des *Mini-Protean 3 Electrophoresis Systems* vorgelegt und nach der Polymerisation darüber das Sammelgel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammern mit Laufpuffer gefüllt. Die aufzutragenden Proteinproben enthielten dieselbe Proteinmenge von in der Regel 20 µg und wurden auf ein Volumen von 20 µl mit RIPA-Lysepuffer aufgefüllt. Dem wurden 10 µl eines Ansatzes aus dreifachem Probenpuffer und 30% 1 M DTT in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß beigemischt und in einem Heizblock bei 100°C für 5 min aufgekocht. Anschließend wurden die denaturierten, angefärbten Proteinlösungen in die jeweiligen Probenaschen gefüllt. Zusätzlich mussten Marker zur Bestimmung des Molekulargewichts aufgetragen werden. 1 µl des biotinylierten *Low Range* Markers wurde mit 33,3 µl RIPA-Lysepuffer und 16,7 µl des Ansatzes aus

dreifachem Probenpuffer und 30% 1 M DTT versetzt und für 30 sec bei 100°C gekocht, bevor 15 µl dieser Markerlösung in eine Probenflasche gefüllt wurden. Der *Prestained* Marker wurde unbehandelt für 5 min bei 100°C aufgekocht und 7 ml in eine Probenflasche gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V durchgeführt, bis die farbige Lauffront der Proben am unteren Gelende angekommen war. Aufbau und Durchführung im Einzelnen verliefen nach Herstellerangaben.

3.7 Western Blot

Beim Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch ein senkrecht zum Gel ausgerichtetes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wobei sie ihr Auftrennungsmuster beibehalten. Mit Hilfe spezifischer Antikörper können die entsprechenden Antigene auf den aufgetrennten Proteinen erkannt und diese spezifische Bindung durch einen gegen den ersten Antikörper gerichteten, markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht werden. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen aus der SDS-PAGE wurde luftblasenfrei auf die Nitrozellulosemembran aufgelegt und zwischen je zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren und *Blotting*-Schwämmen in die *Mini Trans Blot Cell* eingespannt. Dabei war zu beachten, dass sich das Gel auf der Seite der Kathode befand und somit die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode auf die Membran transferiert werden konnten. Die *Blotting*-Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und mit einem eisgefüllten Einsatz und einem Rührmagneten bestückt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA (ca. 80 V) eine Stunde lang bei 4°C auf dem Magnetrührer. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran zunächst in TBS überführt, um ein Austrocknen zu verhindern. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern auf den verbliebenen freien Bindungsstellen der Membran zu vermeiden, mussten diese Bindungsstellen mit einem Protein blockiert werden, welches seinerseits nicht von den eingesetzten Antikörpern erkannt werden durfte. Hierzu wurde *Slim-Fast*[®] Schokolade verwendet. Die Membran wurde eine Stunde lang in einer mit 0,5% TBST verdünnten 4% *Slim-Fast*[®]-Lösung geblockt. Danach wurde der

Membranabschnitt mit dem biotinylierten Marker abgetrennt und in TBS aufbewahrt, während die restliche Membran mit einem spezifischen Erstantikörper wahlweise für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer mit 0,5% TBST verdünnten 2,5% *Slim-Fast*[®]-Lösung inkubiert wurde. Als Erstantikörper wurde dabei der polyklonale *Rabbit* Anti-P306 AK in der Konzentration 1:500 zum Nachweis der differentiellen Genexpression eingesetzt. Nach der Inkubation wurde die Membran kurz in 0,5% TBST geschwenkt und dreimal fünf Minuten lang in 0,5% TBST gewaschen, um ungebundene Erstantikörper zu entfernen. Danach wurden die Membran mit den gebundenen Erstantikörpern eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem HRP-konjugierten *Goat Anti-Rabbit* AK in der Konzentration 1:2000 in einer mit 0,5% TBST verdünnten 2,5% *Slim-Fast*[®]-Lösung inkubiert. Gleichzeitig wurde der biotinylierte Marker mit HRP-konjugiertem Streptavidin in der Konzentration 1:10 000 in einer mit 0,5% TBST verdünnten 2,5% *Slim-Fast*[®]-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden Membran und Markerabschnitt kurz in 0,5% TBST geschwenkt und zweimal fünf Minuten lang in 0,5% TBST gewaschen. Danach folgte ein vierminütiger Waschschrift in 3% TBST, anschließend wieder Ausschwenken und Waschen in 0,5% TBST. Abschließend wurde zweimal fünf Minuten lang in TBS gewaschen. Die abgetropfte Membran wurde eine Minute lang in einem Gemisch aus je 1 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 des entsprechenden Kits inkubiert, wobei die Meerrettich-Peroxidase dieses Gemisch unter Lichtemission umsetzte. Auf die in Klarsichtfolie eingeschlagene Membran wurde in der Dunkelkammer ein Film aufgelegt und in einer Kassette belichtet. Dieselbe Membran wurde anschließend wieder verwendet und zur Kontrolle das *housekeeping gene* GAPDH nach obigem Schema markiert. Als Erstantikörper diente ein *Mouse Anti-Rabbit* GAPDH AK 1:5000, welcher mit dem humanen GAPDH kreuzreagierte und mit einem HRP-konjugierten *Goat Anti-Mouse* AK in der Konzentration 1:2000 markiert wurde.

3.8 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung aus Zellen wurde das *RNeasy Mini Kit* benutzt. Bei dem Verfahren werden die Zellen zunächst durch ein Gemisch aus denaturierendem RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 lysiert und Ribonukleasen inaktiviert. Das Lysat wird mit Ethanol vermischt, um die Bindungsfähigkeit zu optimieren, und in eine *RNeasy Mini* Säule mit Siliciumdioxid-Gel-Membran geben, an die die RNA bindet. Dabei werden RNA-Ketten einer Länge von über 200 Nukleotiden isoliert, während kürzere RNAs, wie zum Beispiel rRNA und tRNA, und die restlichen Lysatbestandteile mit RW1- und RPE-Puffer ausgewaschen werden. Dadurch wird vor allem langkettige mRNA angereichert, die letztendlich mit reinem Wasser eluiert werden kann. Die maximale Bindungskapazität einer Säule beträgt 100 mg RNA und damit etwa 1×10^7 humane Zellen. Die RNA-Isolierung und die Präparation der im Kit gelieferten Puffer erfolgten nach Angaben des Herstellers und mit RNase-freiem Material.

Bei der RNA-Isolierung der adhärennten Monozyten wurde der Überstand aus den Kulturflaschen abgesaugt und je 350 μ l RLT-Puffer/ β -ME auf dem Flaschenboden verteilt. Das Lysat wurde sorgfältig mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Fall der RNA-Isolierung von bereits in Suspension vorliegenden Zellen wurde das *Pellet* bei einer Zellzahl kleiner 5×10^6 in 350 μ l RLT-Puffer/ β -ME lysiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Lysat im Reaktionsgefäß auf dem Vortex homogenisiert und dann mit 350 μ l 70% Ethanol durch mehrmaliges Pipettieren gut vermischt. Das Lysat wurde in die *RNeasy Mini* Säule überführt und bei 8000 x g für 15 sec in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Darauf folgten ein Waschschrift mit 700 μ l RW1-Puffer und die Zentrifugation bei 8000 x g für 15 sec und zwei Waschschrift mit je 500 μ l Ethanol-verdünntem RPE-Puffer bei 8000 x g für 15 sec und 2 min. Die gebundene RNA wurde mit 50 μ l RNase freiem Wasser durch Zentrifugation bei 8000 x g für 1 min aus der Membran gelöst. Das Eluat wurde erneut auf die

Membran gegeben und zentrifugiert, um die Ausbeute zu erhöhen, und konnte anschließend bei -80 °C eingefroren werden.

3.9 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde an Hand einer Probe von etwa 7 µl des Eluats aus der RNA-Isolierung im Fotometer *Gene Quant™ II* bestimmt. Dazu wurde der Nullwert für die Wellenlängen 260 nm und 280 nm mit RNase-freiem Wasser festgelegt und die Absorptionswerte der Proben ermittelt. Die RNA-Konzentration wurde vom Fotometer an Hand des Messwerts für 260 nm berechnet. Der Quotient aus den Messwerten für 260 nm und 280 nm diene als Maß für die Reinheit der RNA-Probe, wobei der Idealwert bei einer *Ratio* zwischen 1,8 und 2,0 lag. Die Kalibrierung und Messung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.10 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Die RT-PCR ist eine Methode um die Genexpression auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Sie kann in zwei Abschnitte unterteilt werden. In einem ersten Schritt synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase ausgehend von der mRNA-Matrize eine komplementäre cDNA. Dabei setzt das Enzym mit 5' – 3'-Polymeraseaktivität an einem Oligo(dT)-Primer an, der an den Poly(A)-Schwanz des 5'-Ende der mRNA hybridisiert. Im zweiten Abschnitt wird in einer mehrzyklischen PCR ausgehend von der synthetisierten cDNA eine ausgewählte DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert. Dazu müssen zumindest die an die ausgewählte DNA-Sequenz beidseits angrenzenden Nukleotidsequenzen bekannt sein, da hier die spezifischen Primer ansetzen. Ein PCR-Zyklus kann in drei Stufen unterteilt werden. In einem ersten Denaturierungsschritt werden die DNA-Proben auf 95°C erhitzt und dadurch doppelsträngige DNA-Hybride in Einzelstränge gespalten. Oligonukleotid-Primer, die vier verschiedenen Desoxyribonukleotide und die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase liegen im Überschuss vor. Im folgenden Renaturierungsschritt wird die Probe auf eine Temperatur um 55°C abgekühlt, wobei die Primer an die

komplementären Abschnitte auf dem *sense*- bzw. *antisense*-Strang hybridisieren (*Annealing*). Ausgehend von ihrer Position bezogen auf die ausgewählte Sequenz der synthetisierten cDNA bezeichnet man einen Primer als *forward*- und den anderen als *reverse-Primer*. Im dritten Schritt wird die Temperatur wieder auf 72°C erhöht, welches das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase darstellt. Sie setzt an den 3'-Enden der Primer an und synthetisiert den jeweils komplementären DNA-Strang. Dieser Zyklus wiederholt sich mehrmals, wobei sich vor allem die ausgewählte Sequenz zwischen den Primern als doppelsträngige DNA anreichert. Durch Abschließendes Abkühlen der Proben auf 4°C - 12°C wird die Reaktion angehalten. Die Spezifität, mit der die Primer an die Matrizenstränge hybridisieren, hängt entscheidend von der *Annealing*-Temperatur während des Renaturierungsschrittes ab. Den oberen Grenzwert für die *Annealing*-Temperatur setzt der jeweilige Schmelzpunkt der Primer fest. Die Schmelztemperatur T_m ist als diejenige Temperatur definiert, bei der 50% der Primer nicht an das DNA-*Template* gebunden sind. Sie lässt sich nach Wallace mit folgender Formel abschätzen: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (C + G)$. A, T, C und G beschreiben dabei die Anzahl der entsprechenden Nukleotide, aus denen der Primer aufgebaut ist. Im Bereich der Schmelztemperatur binden die Primer mit der höchsten Spezifität. Bei niedrigeren Temperaturen hingegen können auch unspezifischere Bindungen eingegangen werden. Diesem Umstand trägt die so genannte *Touchdown*-PCR Rechnung. Hierbei werden zu Beginn beispielsweise zehn dreistufige Zyklen gefahren, wobei bei jedem Zyklus die Temperatur während des Renaturierungsschrittes um ein weiteres Grad Celsius gesenkt wird. Anschließend wird die PCR bei der erreichten *Annealing*-Temperatur unverändert über die gewünschte Anzahl von Zyklen durchgeführt. Als groben Anhaltspunkt für die *Annealing*-Temperatur kann man zunächst von einer Temperatur 2°C - 5°C unterhalb des Schmelzpunktes ausgehen. Der Sinn des Verfahrens liegt darin, dass bei der höchsten Temperatur, bei der die Primer hybridisieren können, die spezifischste Bindung auftritt und damit auch genau die ausgewählte DNA-Sequenz amplifiziert wird. Bei den höheren Temperaturen zu Beginn des *Touchdowns* werden deshalb die hochspezifischen Sequenzen bevorzugt gebildet. Im weiteren Verlauf kann auf

Grund deren exponentiellen Amplifikation der Effekt unspezifischer Bindungsmöglichkeiten bei den niedrigeren Temperaturen vernachlässigt werden.

3.10.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem *Superscript III First-Strand Synthesis Kit* durchgeführt. Die einzelnen Reagenzien des Kits wurden auf Eis aufgetaut und bearbeitet. Eine Probe von maximal 500 ng der isolierten RNA wurde in ein 0,2 ml *Microtube* überführt und gegebenenfalls mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10,75 μ l aufgefüllt. Dazu wurden je 1 μ l 50 μ M Oligo(dT)20-Primerlösung und 10 mM dNTP-Mix gegeben und die Probe bei 65°C für 5 min im *Cycler* erhitzt. Anschließend wurde die Probe eine Minute lang auf Eis abgekühlt. Aus den übrigen Komponenten des Kits wurde ein Mastermix erstellt. Auf eine Probe bezogen setzte er sich zusammen aus 4 μ l eines Gemisches aus fünffachem RT-Puffer und 25 mM MgCl₂, 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l des RNase-Inhibitors *RNaseOut* und 0,25 μ l der Reversen Transkriptase (200 U/ μ l). 7,5 μ l des Mastermixes wurden der Probe beigemischt und im *Cycler* bei 42°C für 50 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min terminiert und die Probe auf 12°C abgekühlt.

3.10.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Aus den Reagenzien des Amplitaq PCR-Sets und den Primern wurde ein Mastermix erstellt. Auf eine Probe bezogen setzte er sich je nach gesuchtem Gen aus folgenden Substanzen zusammen.

Tabelle 11: Mastermixe für PCR

Substanz	Für Nachweis von β 2M	Für Nachweis von P306
Deionisiertes, autoklaviertes Wasser	9,6 μ l	10 μ l
10 x Reaction Buffer 4	1,5 μ l	1,5 μ l
25 mM MgCl ₂	0,9 μ l	0,9 μ l

10 mM dNTP-Mix	0,15 µl	0,15 µl
DMSO	0,75 µl	0,75 µl
10 µM <i>forward-Primer</i>	0,5 µl	0,3 µl
10 µM <i>reverse-Primer</i>	0,5 µl	0,3 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	0,1 µl

14 µl des Mastermixes wurden je 0,2 ml *Microtube* vorgelegt und in der Regel je 1 µl cDNA für den Nachweis von β 2M bzw. 1-2 µl cDNA für den Nachweis von p306 zugegeben. Das *housekeeping gene* β 2 -Mikroglobulin fungierte als Positivkontrolle. Des Weiteren wurde bei jeder PCR ein *Microtube* lediglich mit dem Mastermix gefüllt und diente somit als Negativkontrolle. in der Gel-elektrophorese. Die Proben wurden anschließend in den *Cycler* gestellt und die jeweiligen PCR-Programme gestartet.

Je nach nachzuweisendem Gen und eingesetzten Primern unterschied man folgende Programme (Die Oligonukleotidsequenzen der p306-spezifischen Primer sind bereits in der Einleitung dieser Arbeit aufgeführt worden):

Primerpaar F0/R0:

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 3 min
2. *Touch down* in 10 Zyklen von 65°C auf 55°C in 1°C-Schritten

Temperatur	95°C	65°C - 55°C	72°C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

3. 30 - 32 Zyklen bei konstanter *Annealing*-Temperatur
4. terminale Elongation bei 72°C für 7 min
5. Abkühlung auf 12°C

Primerpaar F0/R3:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. *Touch down* in 10 Zyklen von 65 °C auf 55 °C in 1 °C-Schritten

Temperatur	95 °C	65 °C - 55 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

3. 31 - 35 Zyklen bei konstanter *Annealing*-Temperatur

Temperatur	95 °C	55 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

4. terminale Elongation bei 72 °C für 7 min
5. Abkühlung auf 12 °C

Primerpaar F1/R1:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. *Touch down* in 10 Zyklen von 66 °C auf 56 °C in 1 °C-Schritten

Temperatur	95 °C	66 °C - 56 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

3. 32 - 33 Zyklen bei konstanter *Annealing*-Temperatur

Temperatur	95 °C	56 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

4. terminale Elongation bei 72 °C für 7 min
5. Abkühlung auf 12 °C

Primerpaar F2/R2:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. *Touch down* in 10 Zyklen von 64 °C auf 54 °C in 1 °C-Schritten

Temperatur	95 °C	64 °C - 54 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

3. 32 - 33 Zyklen bei konstanter *Annealing*-Temperatur

Temperatur	95 °C	54 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

4. terminale Elongation bei 72 °C für 7 min
5. Abkühlung auf 12 °C

Primerpaar F3/R3:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. *Touch down* in 10 Zyklen von 65 °C auf 55 °C in 1 °C-Schritten

Temperatur	95 °C	65 °C - 55 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

3. 30 - 33 Zyklen bei konstanter *Annealing*-Temperatur

Temperatur	95 °C	55 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

4. terminale Elongation bei 72 °C für 7 min
5. Abkühlung auf 12 °C

Primerpaar F3/R2:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. *Touch down* in 10 Zyklen von 64 °C auf 54 °C in 1 °C-Schritten

Temperatur	95 °C	64 °C - 54 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

3. 33 - 35 Zyklen bei konstanter *Annealing*-Temperatur

Temperatur	95 °C	54 °C	72 °C
Dauer	20 sec	30 sec	1 min

4. terminale Elongation bei 72 °C für 7 min
5. Abkühlung auf 12 °C

Primerpaar β 2M-*forward*- und *reverse-Primer* (5'-GGGTTTCATCCATCCGA CAT-3' und 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCGA-3'):

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. 25 Zyklen bei konstanter *Annealing*-Temperatur

Temperatur	95 °C	59 °C	72 °C
Dauer	15 sec	15 sec	30 sec

4. terminale Elongation bei 72 °C für 7 min
5. Abkühlung auf 12 °C

3.10.3 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese wandert die in der PCR amplifizierte DNA auf Grund ihrer negativen Eigenladung zur Anode und wird dabei gemäß der Größe der DNA-Fragmente in der Gelmatrix aufgetrennt. Je kürzer die Fragmente sind, desto schneller wandern sie im 2% Agarosegel. 1 g Agarose wurde unter Aufkochen in 50 ml TAE-Puffer gelöst und 1 µl Ethidiumbromid beigemischt. Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht und interkaliert in die DNA. Das Gel wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer eingelegt und mit einem Gemisch aus 3 µl des PCR-Produkts und 2 µl sechsfachem Probenpuffer je Proben tasche beladen. Außerdem wurden 4 µl der 1 kb DNA-Leiter als Marker eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt und anschließend das Bandenmuster bei 302 nm im *Bio Doc Transluminator* analysiert und fotografiert.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypisierung durch FACS-Analysen

Die in den Experimenten verwendeten Zellen wurden nach ihrer Kultivierung bzw. MACS-Isolierung einer FACS-Analyse unterzogen, um ihren Phänotyp und den Reinheitsgrad der Zellpopulation zu bestimmen. Im Folgenden sind die Zellpopulationen im Einzelnen mit dem jeweils verwendeten *Panel* zur Färbung mit FACS-Antikörpern aufgeführt. Die jeweilige Analyse ist in Form von *Dot Plots* dargestellt. Als Isotypkontrolle wurde mit fluoreszierenden Anti-IgG1 FACS-Antikörpern gefärbt. Die Messparameter wurden so gewählt, dass die Punktelwolke der Isotypenkontrolle zu 99% im linken unteren Quadranten lag. An Hand der Quadranten wurde die relative Verlagerung (*Shift*) der Punktelwolken für die einzelnen Messproben bestimmt und in Prozentwerten angegeben.

4.1.1 FACS-Analyse von MACS-isolierten Monozyten

Eine FACS-Analyse von Monozyten konnte nur mit MACS-isolierten Monozyten durchgeführt werden, da bei der Isolierung in der Kulturflasche die Monozyten

am Boden adhärerten. Für die Färbung mit FACS-Antikörpern wurde folgendes *Panel* benutzt.

Tabelle 12: *Panel* für FACS-Färbung von MACS-isolierten Monozyten

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle
2	Anti-CD19	10 µl	B-Zellen	Anti-CD3	6 µl	T-Zellen
3	Anti-CD14	6 µl	Monozyten, Makro- phagen	Anti-CD56	6 µl	NK-Zellen

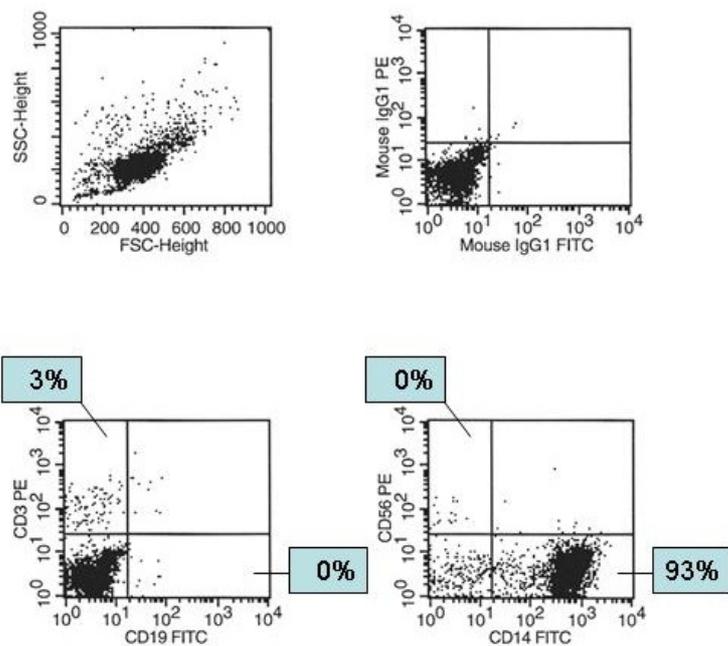


Abbildung 3: FACS-Analyse von MACS-isolierten Monozyten.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte eine klare CD14⁺ Zellpopulation hauptsächlich aus Monozyten mit nur geringfügigen Verunreinigungen durch Lymphozyten und NK-Zellen.

4.1.2 FACS-Analyse von mDC

Für die Färbung von *Monocyte-derived Dendritic Cells* mit FACS-Antikörpern wurde folgendes *Panel* benutzt.

Tabelle 13: *Panel* für FACS-Färbung von mDC

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle
2	Anti-CD1a	6 µl	DC u.a.	Anti-CD83	6 µl	DC-Reife
3	Anti-CD14	6 µl	Monozyten, Makro- phagen	Anti-HLA-DR	6 µl	MHC-II; APC
4	Anti-CD19	10 µl	B-Zellen	Anti-CD3	6 µl	T-Zellen
5	Anti-CD86	6 µl	Kostimulator B7-2; B-Zellen, Monozyten	Anti-CD80	6 µl	Kostimulator B7-1; B-Zellen, DC, Makro- phagen

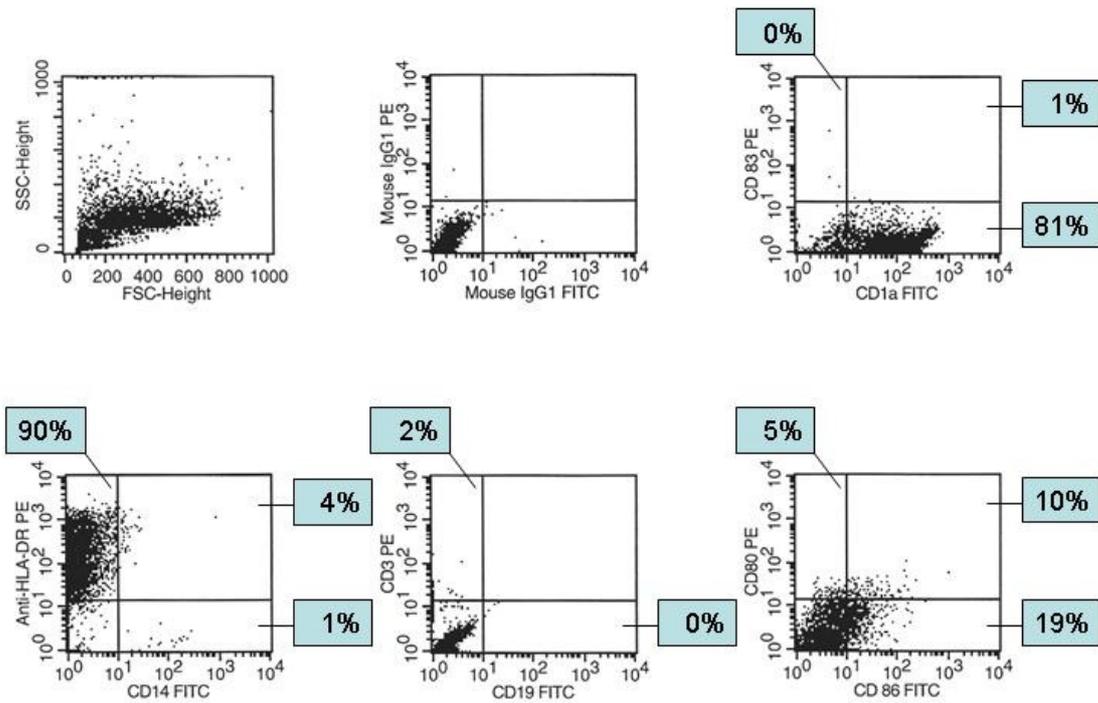


Abbildung 4: FACS-Analyse von mDC.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte eine klare $CD1a^+$, $HLA-DR^+$, $CD14^-$ Zellpopulation von unreifen dendritischen Zellen und nur geringfügige Verunreinigungen durch Lymphozyten.

4.1.3 FACS-Analyse von CD34 DC

Für die Färbung von $CD34^+$ cell-derived Dendritic Cells mit FACS-Antikörpern wurde folgendes *Panel* benutzt.

Tabelle 14: *Panel* für FACS-Färbung von CD34 DC

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle
2	Anti-CD1a	6 μ l	DC u.a.	Anti-CD83	6 μ l	DC-Reife
3	Anti-CD14	6 μ l	Monozyten, Makro- phagen	Anti-HLA-DR	6 μ l	MHC-II; APC

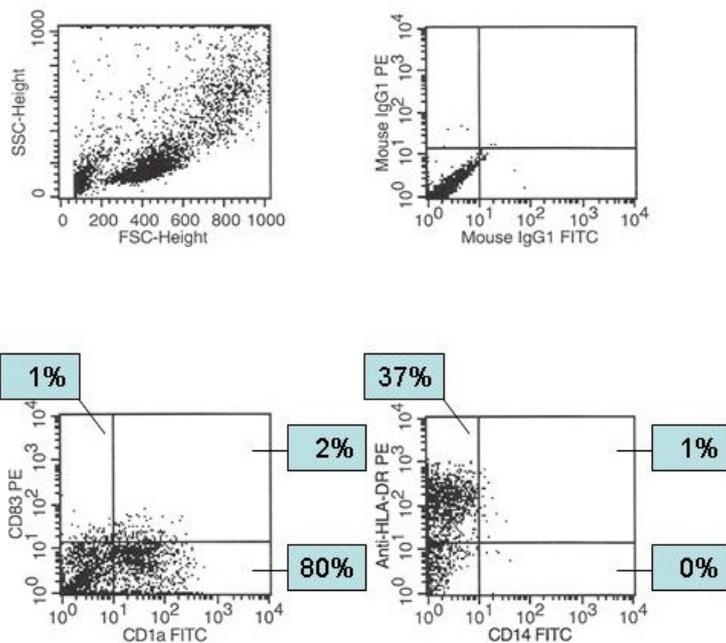


Abbildung 5: FACS-Analyse von CD34 DC.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte eine klare $CD1a^+$, $HLA-DR^+$, $CD14^-$ Zellpopulation von unreifen dendritischen Zellen.

4.1.4 FACS-Analyse von MACS-isolierten *Blood DC*

Für die Färbung von *Blood Dendritic Cells* mit FACS-Antikörpern wurde folgendes *Panel* benutzt.

Tabelle 15: *Panel* für FACS-Färbung von *Blood DC*

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle
2	Anti-HLA-DR	10 μ l	MHC-II; APC	Anti-CD11b; Anti-CD56; Anti-CD19; Anti-TCR α/β	je 6 μ l	NK-Zellen, Monozyten, B-Zellen, T-Zellen

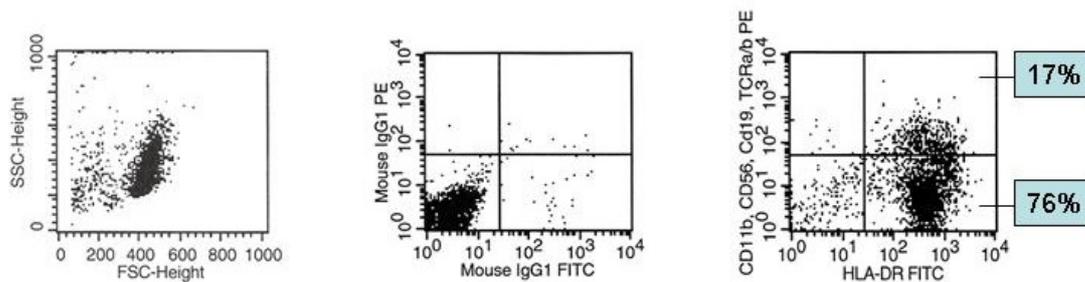


Abbildung 6: FACS-Analyse von *Blood DC*.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte eine HLA-DR⁺ Zellpopulation von dendritischen Zellen, die von den übrigen MHC-II tragenden Zellen des peripheren Bluts wie den Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen weitgehend befreit wurde.

4.1.5 FACS-Analyse von MACS-isolierten plasmazytoiden DC

Für die Färbung von plasmazytoiden (lymphatischen) dendritischen Zellen mit FACS-Antikörpern wurde folgendes *Panel* benutzt.

Tabelle 16: *Panel* für FACS-Färbung von plasmazytoiden DC

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle
2	Anti-BDCA-2	10 μ l	Plasmazytoide DC	Anti-CD123	6 μ l	IL-3R α ; KM-Stammzellen, Monozyten, Granulozyten, Mega-karyozyten

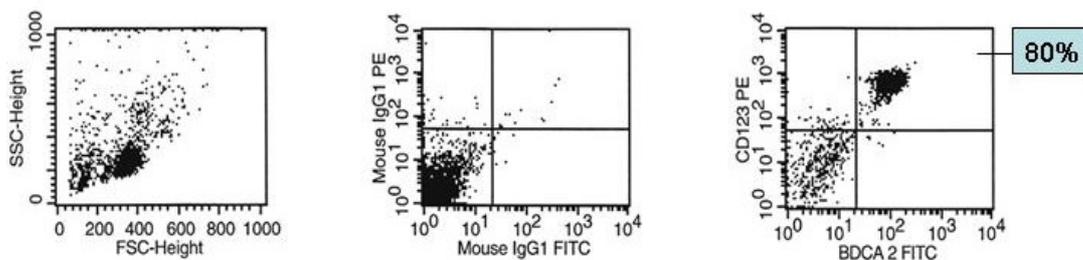


Abbildung 7: FACS-Analyse von plasmazytoiden DC.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

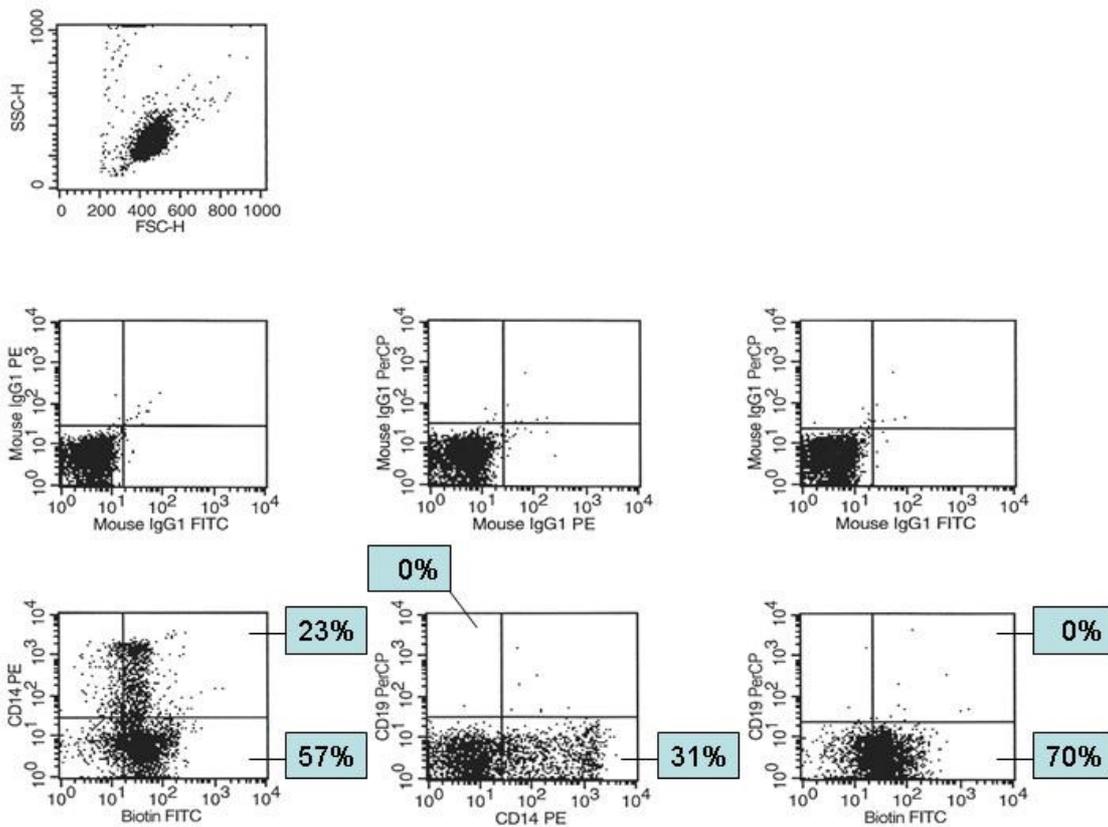
Die FACS-Analyse zeigte eine klare BDCA-2⁺, CD123⁺ Zellpopulation an plasmazytoiden dendritischen Zellen.

4.1.6 FACS-Analyse von MACS-isolierten myeloiden CD1c⁺ DC

Für die Färbung von myeloiden CD1c⁺ dendritischen Zellen wurde eine Dreifachfärbung mit den FACS-Antikörpern Anti-Biotin FITC, Anti-CD14 PE und Anti-CD19 PerCP durchgeführt. Der Anti-Biotin FITC Antikörper markierte dabei indirekt das Antigen CD1c über die in der MACS-Isolierung verwendeten biotinylierten Anti-BDCA-1 Antikörper.

Tabelle 17: *Panel* für FACS-Färbung von myeloiden CD1c⁺ DC

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle
2	Anti-Biotin	6 µl	Myeloide DC	Anti-CD14	6 µl	Monozyten, Makrophagen
Ansatz	PerCP-AK	Menge	Spezifität			
1	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle			
2	Anti-CD19	6 µl	B-Zellen			

Abbildung 8: FACS-Analyse von myeloiden CD1c⁺ DC.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte eine heterogene Population von CD1c⁺ DC, die in unterschiedlichem Maße CD14⁺ war. Eine Verunreinigung durch B-Zellen lag praktisch nicht vor.

4.1.7 FACS-Analyse von makrophagenähnlichen Zellen

Monozyten, die sieben Tage lang in RP10-Medium mit und ohne Zusatz von GM-CSF inkubiert worden waren, wurden nach folgendem *Panel* von FACS-Antikörpern gefärbt.

Tabelle 18: *Panel* für FACS-Färbung von makrophagenähnlichen Zellen mit und ohne Zusatz von GM-CSF

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle
2	Anti-CD1a	6 µl	DC u.a.	Anti-CD83	6 µl	DC-Reife
3	Anti-CD14	6 µl	Monozyten, Makro- phagen	Anti-HLA-DR	6 µl	MHC-II; APC
4	Anti-CD86	6 µl	Kostimulator B7-2; B-Zellen, Monozyten	Anti-CD80	6 µl	Kostimulator B7-1; B-Zellen, DC, Makro- phagen

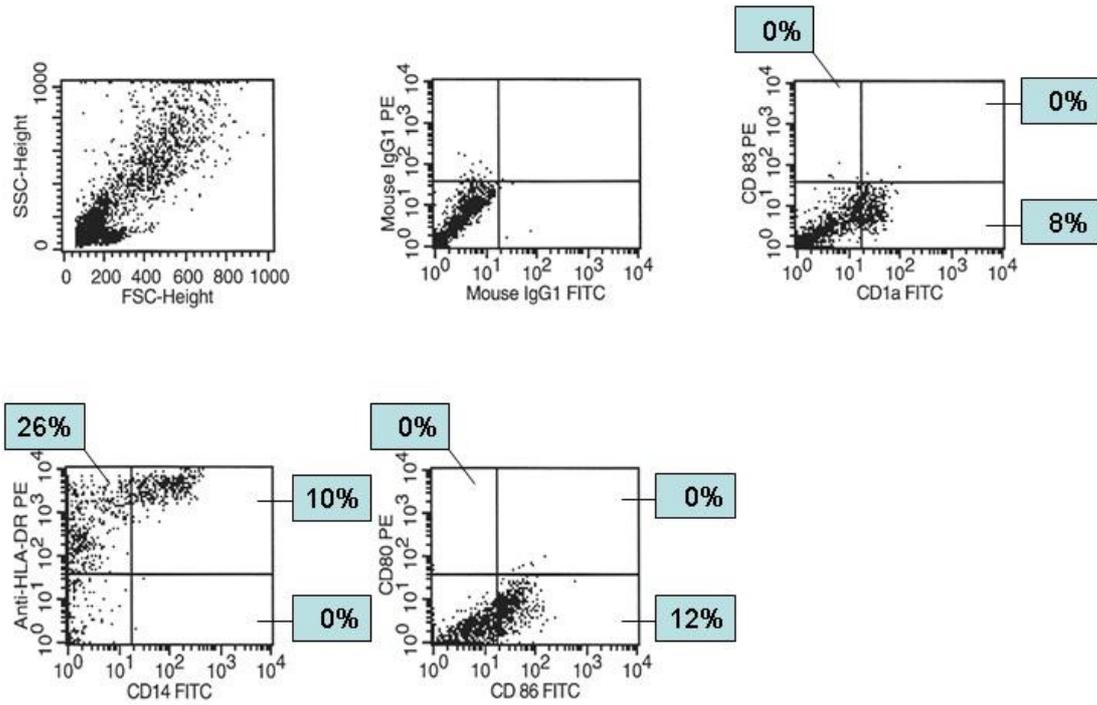


Abbildung 9: FACS-Analyse von makrophagenähnlichen Zellen ohne GM-CSF.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

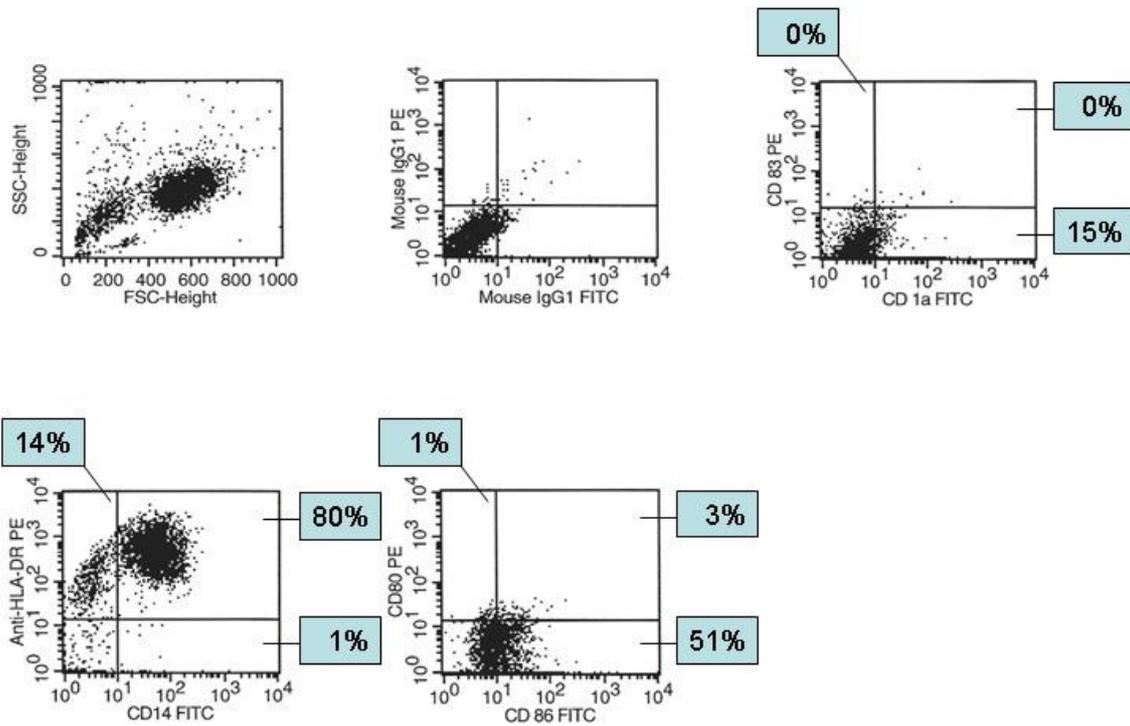


Abbildung 10: FACS-Analyse von makrophagenähnlichen Zellen mit GM-CSF.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte im Gegensatz zu dendritischen Zellen eine nur schwach CD1a⁺ und stark CD14⁺ und HLA-DR⁺ Zellpopulationen von makrophagenähnlichen Zellen. Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 waren kaum exprimiert. Die beiden makrophagenähnlichen Zellgruppen glichen sich phänotypisch (CD1a^{-/low}, CD14⁺, HLA-DR⁺), wobei die mit GM-CSF kultivierte Population insgesamt homogener schien und zu 80% CD14⁺, HLA-DR⁺ war.

4.1.8 FACS-Analyse von MACS-isolierten T-Lymphozyten

Für die Färbung von T-Lymphozyten mit FACS-Antikörpern wurde folgendes Panel benutzt.

Tabelle 19: *Panel* für FACS-Färbung von T-Lymphozyten

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle	Anti-IgG1	6 μ l	Kontrolle
2	Anti-CD3	6 μ l	T-Zellen	Anti-CD19	6 μ l	B-Zellen
3	Anti-CD14	6 μ l	Monozyten, Makro- phagen	Anti-CD56	6 μ l	NK-Zellen

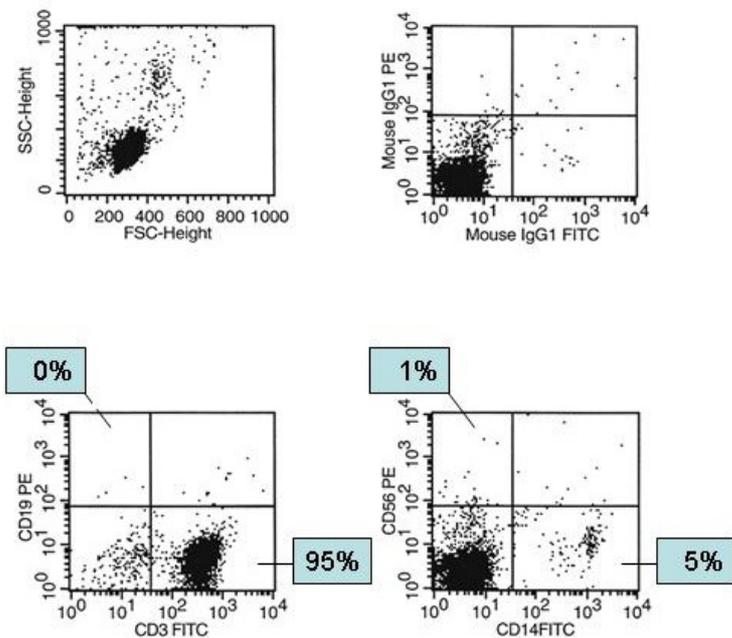


Abbildung 11: FACS-Analyse von T-Lymphozyten.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte eine klare CD3⁺, CD19⁻, CD14⁻, CD56⁻ Zellpopulation von T-Lymphozyten, die weitgehend von B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen befreit worden war.

4.1.9 FACS-Analyse von MACS-isolierten B-Lymphozyten

Für die Färbung von B-Lymphozyten mit FACS-Antikörpern wurde folgendes *Panel* benutzt.

Tabelle 20: *Panel* für FACS-Färbung von B-Lymphozyten

Ansatz	FITC-AK	Menge	Spezifität	PE-AK	Menge	Spezifität
1	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle	Anti-IgG1	6 µl	Kontrolle
2	Anti-CD20	5 µl	B-Zellen	Anti-CD3	6 µl	T-Zellen
3	Anti-CD14	6 µl	Monozyten, Makro- phagen	Anti-CD56	6 µl	NK-Zellen

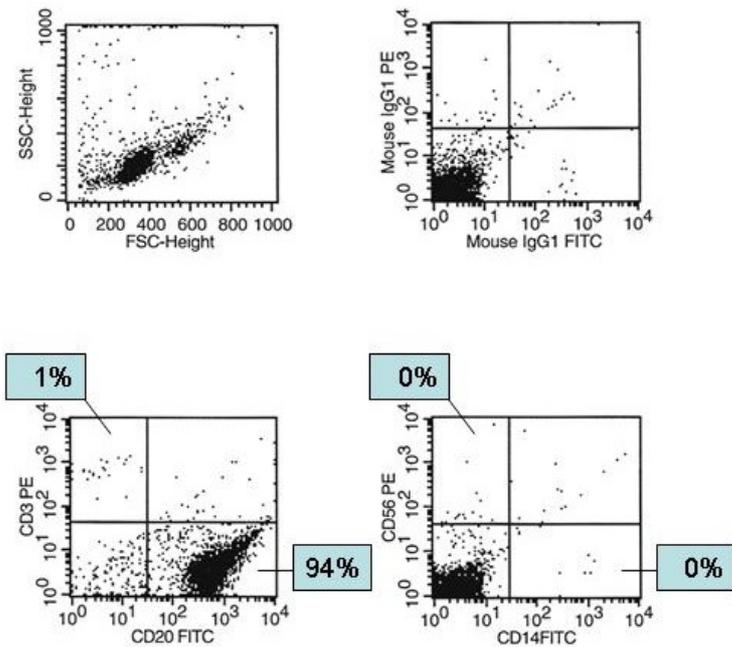


Abbildung 12: FACS-Analyse von B-Lymphozyten.

Angegeben ist der prozentuale Anteil an Zellen im entsprechenden Quadranten.

Die FACS-Analyse zeigte eine klare CD20⁺, CD3⁻, CD14⁻, CD56⁻ Zellpopulation von B-Lymphozyten, die weitgehend von Verunreinigungen durch T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen frei war.

4.2 Nachweis der differentiellen Genexpression von p306 in mDC

Zum Nachweis der differentiellen Genexpression von p306 wurden Monozyten sowohl über Adhärenz als auch durch MACS isoliert und jeweils mit IL-4 und GM-CSF inkubiert, um dendritische Zellen zu generieren. Monozyten und mDC wurden auf die Expression des Gens hin untersucht. In Abb. 4.2.1 A ist die Analyse der RT-PCR für das Primerpaar F0R0 (*forward-Primer* F0 und *reverse-Primer* R0) aufgeführt, während in Abb. 4.2.1 B der Western Blot nach Markierung mit dem poly-klonalen *Rabbit* Anti-P306 Antikörper abgebildet ist.

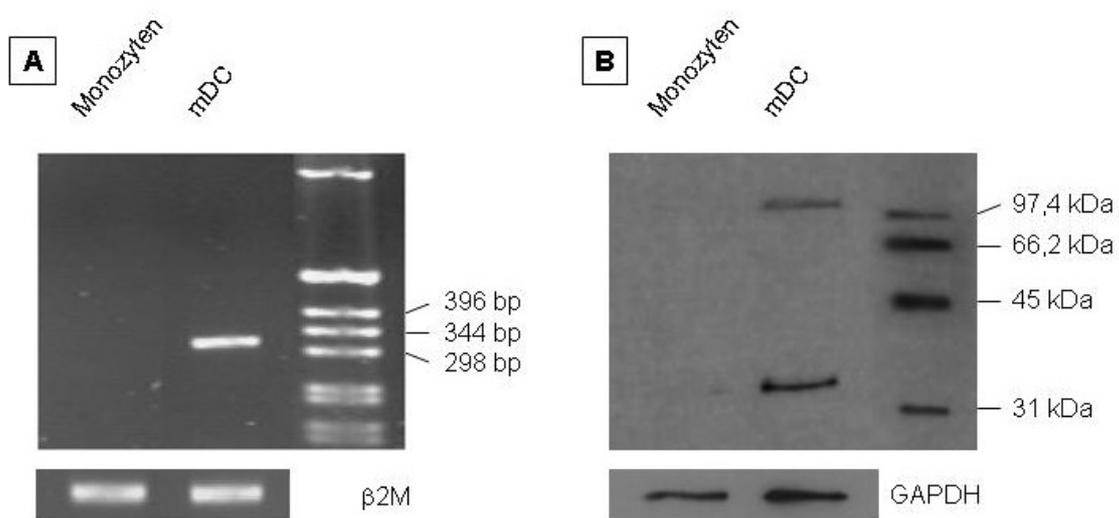


Abbildung 13: Differentielle Genexpression von p306 in mDC.

A: RT-PCR von Monozyten und mDC mit Primerpaar F0R0 und 1kb DNA *Ladder Marker*. In die cDNA-Synthese wurden je Probe 80 ng RNA eingesetzt und anschließend je 1 μ l cDNA für die PCR mit dem Primerpaar F0R0 (*forward-Primer* F0 und *reverse-Primer* R0) bei initialem *Touchdown* über zehn Zyklen von 65°C auf 55°C und 33 Zyklen bei 55°C verwendet. Kontrolle mit β 2-Mikroglobulin.

B: Western Blot von Monozyten und mDC mit Erstantikörper Anti-P306 AK und *Low Range Marker*. Je 20 μ g Protein wurden in die SDS-PAGE eingesetzt. Nach dem *Blotting* wurde die Membran mit dem Anti-P306 Erstantikörper in der Verdünnung 1:500 inkubiert und mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper markiert. Kontrolle mit GAPDH.

Die abgebildeten Bandenmuster zeigen die Hochregulierung und differentielle Expression des p306-Gens in den dendritischen Zellen im Gegensatz zu den Monozyten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene. Für die RT-PCR mit dem Primerpaar F0R0 ließ sich ein Produkt mit einer Länge von etwa 321 bp bestimmen. Die Auswertung des Western Blots ergab zwei Proteinbanden mit etwa 110 kDa und 36 kDa. Die Ergebnisse waren unabhängig davon, ob die Monozyten über Adhärenz oder durch MACS isoliert worden waren.

Um nachzuweisen, dass die im Western Blot dargestellten Banden für P306 spezifisch waren, wurden in einem weiteren Versuch Monozyten und mDC doppelt aufgetragen und die Nitrozellulosemembran nach dem *Blotting* in zwei Abschnitte geteilt. In einem ersten Markierungsschritt wurde der eine Membranabschnitt mit einer Lösung inkubiert, die den Anti-P360 Erstantikörper geblockt mit dem ursprünglichen Immunisierungspeptid enthielt. Der andere Membranabschnitt wurde wie üblich mit dem ungeblockten Erstantikörper inkubiert. Gebundene Erstantikörper wurden anschließend mit konjugiertem Zweitantikörper markiert.

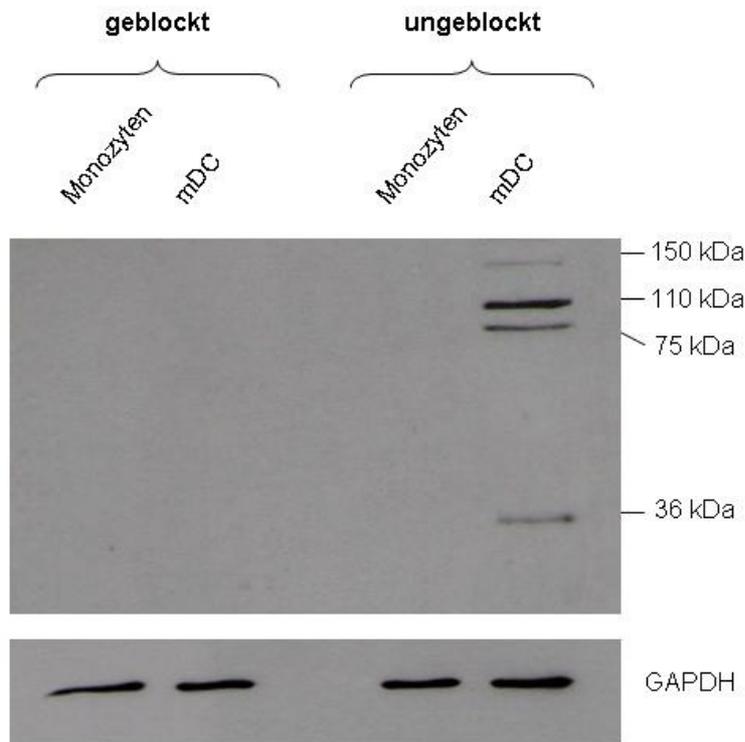


Abbildung 14: Western Blot nach Block des Erstantikörpers Anti-P306 AK mit dem Immunisierungspeptid im Vergleich zum ungeblockten Erstantikörper.

8 μ l des Erstantikörpers *Rabbit* Anti-P306 AK wurden zuerst mit 10 μ l des Immunisierungspeptids von P306 (25 μ g/ml) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 4 ml einer mit 0,5% TBST verdünnten 2,5% *Slim-Fast*[®]-Lösung überführt. Der eine Membranabschnitt wurde in der Lösung mit dem 1:500 verdünnten, geblockten Erstantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Der andere Membranabschnitt wurde wie üblich mit dem Erstantikörper Anti-P306 AK in der Verdünnung 1:500 inkubiert. Anschließend wurden beide Abschnitte gleichermaßen mit HRP-konjugiertem Zweitantikörper markiert und entwickelt. Kontrolle mit GAPDH.

Wie in Abb. 14 dargestellt, ließ sich im Abschnitt, der mit dem geblockten Erstantikörper inkubiert worden war, kein Bandenmuster abbilden, während im Falle des ungeblockten Anti-P306 AK die differentielle Expression zu sehen war. In diesem und in anderen Experimenten zeigte sich, dass der polyklonale Anti-P306 AK zum Teil auch mehr als zwei spezifische Banden markierte. So wurden, wie in obiger Abbildung zu sehen ist, Proteinfragmente einer Größe

von etwa 36 kDa, 75 kDa, 110 kDa und 150 kDa abgebildet. Ausgehend vom zuvor beschriebenen Versuch mit der Blockade des Erstantikörpers durch das Immunisierungspeptid mussten alle aufgezählten Banden als spezifisch bewertet werden.

4.3 Untersuchung der differentiellen Genexpression von p306 durch PCR mit verschiedenen Primern

Zur weiteren Untersuchung der differentiellen Genexpression insbesondere in Bezug auf die beiden bekannten Spleißvarianten RNA I und II wurden mehrere RT-PCRs mit verschiedenen Kombinationen von Primern durchgeführt. Während der *forward-Primer* F0 nur an der kurzen cDNA I-Sequenz AK058145 ansetzen konnte, lagen die Bindungsstellen für die *reverse-Primer* R2 und R3 nur auf der langen cDNA II-Sequenz NM_145018. Die übrigen Primer konnten an beiden Spleißvarianten ansetzen. An Hand der bekannten Nukleotidsequenzen der beiden Spleißvarianten und der Primer ließ sich für die jeweilige Kombination von Primern die entsprechend zu erwartende Sequenz des PCR-Produkts bestimmen.

Tabelle 21: Länge der jeweils zu erwartenden PCR-Produkte in Abhängigkeit von den Primerpaaren und den Spleißvarianten

Primerpaar	<i>forward-Primer</i>	<i>reverse-Primer</i>	<i>Annealing-Temp.</i> ; PCR-Zyklenzahl	Länge der erwarteten PCR-Produkte auf	
				cDNA I	cDNA II
F0/R0	F0	R0	55 °C; 33	321 bp	-
F1/R1	F1	R1	56 °C; 33	443 bp	229 bp
F2/R2	F2	R2	54 °C; 32	544 bp	-
F3/R3	F3	R3	55 °C; 30	-	843 bp
F3/R2	F3	R2	54 °C; 35	555 bp	-
F0/R3	F0	R3	55 °C; 35	-	-

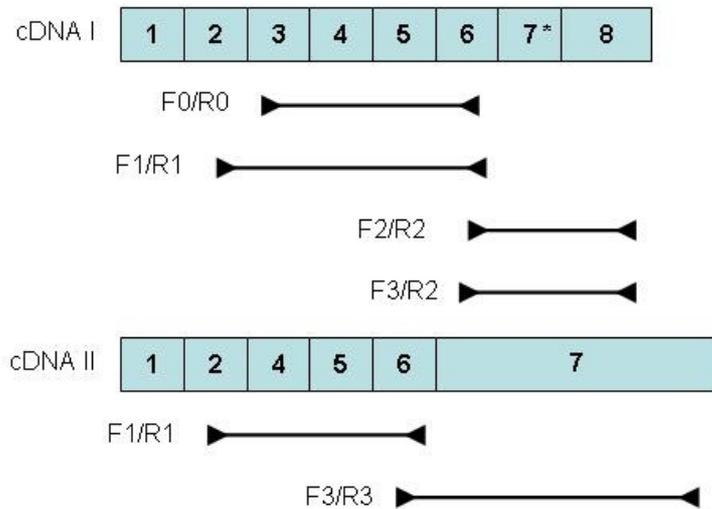


Abbildung 15: Model der Primerbindungsstellen.

Aufgeführt sind die verschiedenen Primerpaare F0/R0, F1/R1, F2/R2, F3/R3, F3/R2 einschließlich der voraussichtlich amplifizierten Sequenzen. Die cDNA I -Sequenz AK058145 ist von der Spleißvariante mRNA I mit den Exons 1 - 6, dem Exonabschnitt 7* und Exon 8 abgeleitet und die cDNA II -Sequenz NM_145018 entsprechend von der Spleißvariante mRNA II mit den Exons 1, 2 und 4 - 7.

Demzufolge war in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die Primerpaare F0/R0, F2/R2, F3/R3, F3/R2 jeweils nur eine Bande der angegebenen Länge zu erwarten. Für das Primerpaar F1/R1 hingegen durfte man zwei Banden der Länge 229bp und 443 bp und für das Primerpaar F0/R3 keine Bande erwarten.

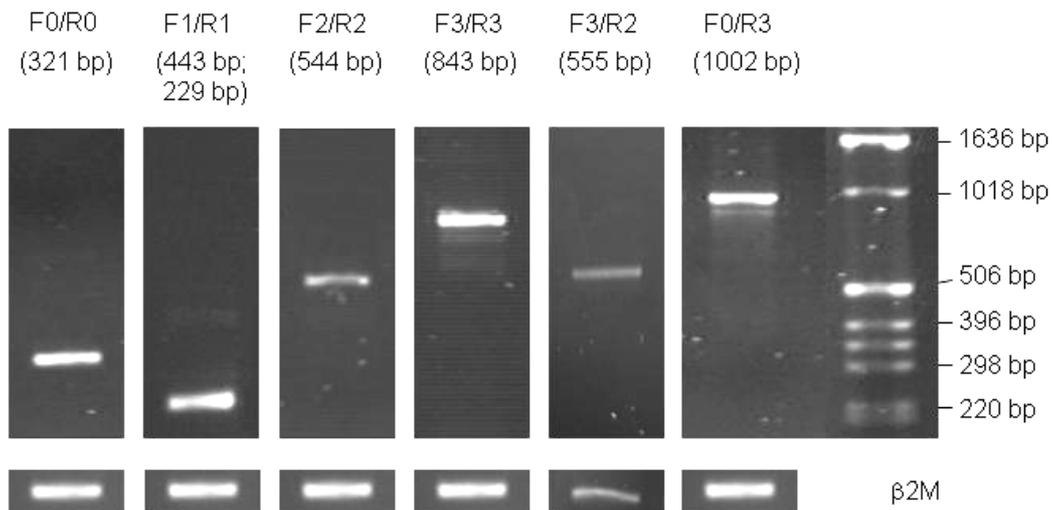


Abbildung 16: RT-PCR mit verschiedenen Kombinationen von Primern.

Dargestellt ist die jeweilige PCR-Analyse von mDC für die Primerpaare F0/R0, F1/R1, F2/R2, F3/R3, F3/R2, F0/R3. In die cDNA-Synthese wurden je 80 ng RNA eingesetzt und die für die Primerpaare jeweils spezifische *Touchdown-PCR* mit 1 μ l der cDNA durchgeführt. Die Länge der PCR-Produkte wurde an Hand des Markers *GeneRuler™* 1kb DNA Ladder bestimmt. Kontrolle mit $\beta 2$ -Mikroglobulin.

Die Ergebnisse der PCR-Analysen konnten die rechnerischen Vorhersagen bezüglich der Längen der jeweiligen PCR-Produkte für die Primerpaare F0/R0 mit 321 bp, F2/R2 mit 544 bp, F3/R3 mit 843 bp und F3/R2 mit 555 bp bestätigen. Für das Primerpaar F1/R1 waren zwei Banden erwartet worden. Das kürzere Produkt von 229 bp war als starke Bande, das längere Produkt von 443 bp jedoch nur als sehr schwache Bande erkennbar. Für das Primerpaar F0/R3, für das ausgehend von den beiden bekannten Spleißvarianten keine Bande vorausgesagt worden war, erhielt man wider Erwarten eine Bande bei etwa 1000 bp. Man musste deshalb von einer weiteren spezifischen cDNA-Matrize ausgehen, die jedoch nicht das Ergebnis der anderen Primer beeinflusste. Für alle Primerkombinationen blieb das Phänomen der differentiellen Genexpression erhalten.

4.4 Untersuchung der Kinetik der Genexpression von p306

In einer ersten Versuchsreihe zur Untersuchung der Kinetik der Genexpression wurden Monozyten über Adhärenz in *6-Well*-Platten isoliert und über sieben Tage mit IL-4 und GM-CSF inkubiert. Jeden Tag wurden die Zellen aus zwei *Wells* geerntet und lysiert. Die gewonnene RNA wurde in die cDNA-Synthese eingesetzt und anschließend die für die Primerpaare F0/R0, F3/R3 und F0/R3 spezifischen PCRs durchgeführt. Die Proteinlysate der einzelnen Tage wurden im Western Blot aufgetrennt und mit dem Anti-P306 Erstantikörper markiert.

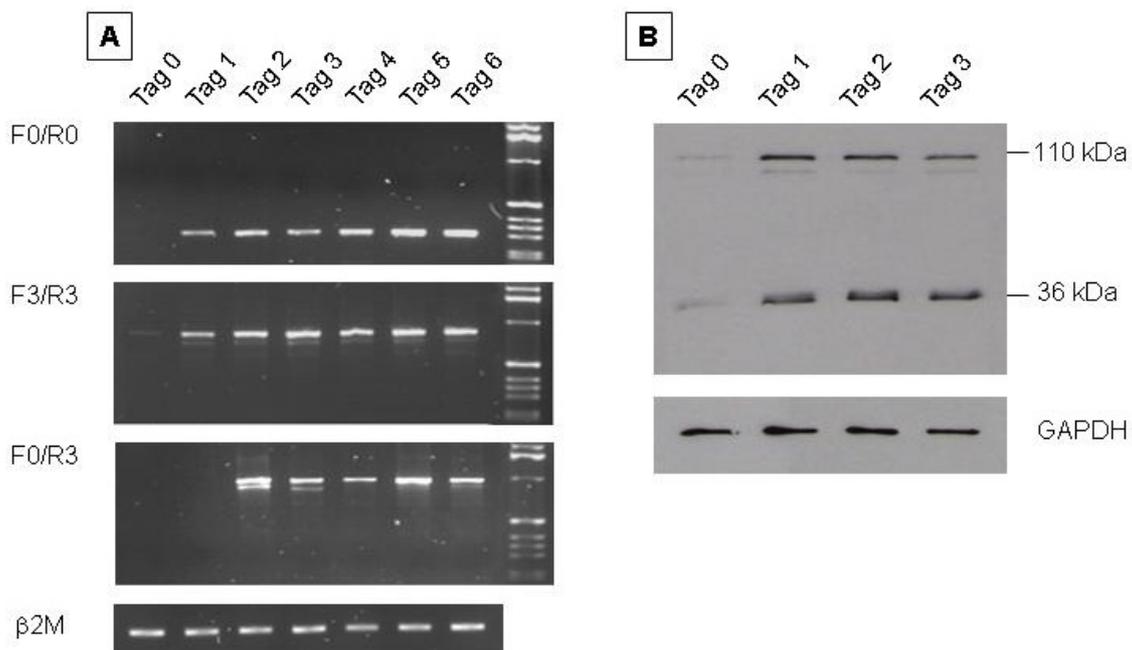


Abbildung 17: Tageskinetik der Genexpression von p306.

A: RT-PCR-Tageskinetiken über 7 Tage. Untersucht wurden die Primerpaare F0/R0 für die kurze Spleißvariante mRNA I, F3/R3 für die lange Spleißvariante mRNA II und F0/R3 für die unbekannte Sequenz. Je Probe wurden 80 ng RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt und die jeweils spezifische *Touchdown*-PCR für die Primerpaare F0/R0, F3/R3 und F0/R3 mit je 1 µl cDNA durchgeführt. Kontrolle mit β2 - Mikroglobulin.

B: Western Blot-Tageskinetik über 4 Tage mit Erstantikörper Anti-P306 AK. In die SDS-PAGE wurden je 10 µg Protein eingesetzt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran mit dem Erstantikörper Anti-P306 AK in der Verdünnung 1:500 bei 4°C über

Nacht inkubiert und anschließend mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper markiert und entwickelt. Kontrolle mit GAPDH.

Die Ergebnisse für die Primerpaare F0/R0, F1/R1 und F3/R3 zeigten eine zunehmende Expression der beiden bekannten Spleißvarianten bereits nach dem ersten Tag der Inkubation mit IL-4 und GM-CSF. Das Produkt der PCR mit dem Primerpaar F0/R3 schien ab dem zweiten Tag verstärkt exprimiert zu werden. Die Proteinexpression korrelierte mit den Ergebnissen der PCR-Analyse. Auch hier war eine deutliche Hochregulation der Expression des Proteins P306 bereits nach dem ersten Inkubationstag sichtbar. In einer neuen Versuchsreihe wurde deshalb die Genexpression innerhalb der ersten 24 Stunden näher untersucht. Dazu wurden die adhärenenten Monozyten wiederum mit IL-4 und GM-CSF inkubiert und zu den Zeitpunkten 0h, 4h, 8h, 12h und 18h geerntet und die RNA für eine RT-PCR-Analyse isoliert.

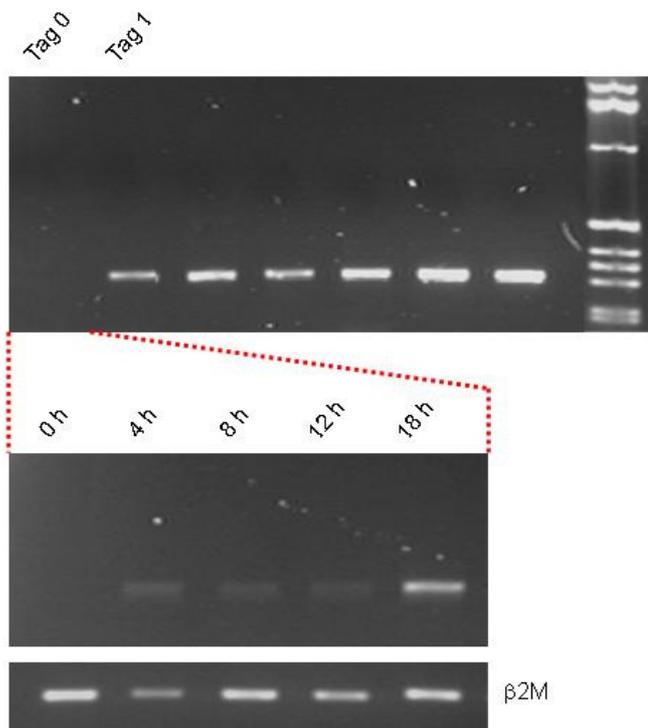


Abbildung 18: RT-PCR-Stundenkinetik mit Primerpaar F0/R0.

Oben zur Veranschaulichung das Ergebnis der RT-PCR-Tageskinetik mit Primerpaar F0/R0; unten das Ergebnis der RT-PCR-Stundenkinetik mit Primerpaar F0/R0 für die

Zeitpunkte 0, 4, 8, 12 und 18 Stunden. Je Probe wurden 40 ng RNA für die cDNA-Synthese verwendet und anschließend je 1 µl cDNA in die PCR mit initialem *Touchdown* und 32 Zyklen nach Protokoll eingesetzt. Kontrolle mit β2-Mikroglobulin.

Die differentielle Genexpression setzte bereits innerhalb der ersten vier Stunden ein, nahm aber erst nach etwa 18 Stunden verstärkt zu.

4.5 Untersuchung der Regulierbarkeit der Genexpression von p306 durch Stimulatoren und Inhibitoren

Für die Untersuchung der Regulierbarkeit der Genexpression wurden adhärente Monozyten über sieben Tage mit IL-4 (20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) in 6-Well-Platten inkubiert und zusätzlich mit Substanzen versetzt, die entweder die DC-Reifung fördern oder die Differenzierung in dendritische Zellen hemmen. Als Stimulatoren wurden der TLR-2 Ligand Pam3Cys, der TLR-3 Ligand Poly I:C, der TLR-4 Ligand LPS oder der TLR-7 Ligand R-848 am sechsten Tag der Inkubation in das jeweilige Kulturmedium zugegeben. Weitere Stimulatoren waren TNF α , IFN γ oder der CD40-Ligand kombiniert mit IFN γ oder PGE $_2$, die ebenfalls am sechsten Tag der Inkubation zugegeben wurden. Von all diesen Substanzen ist bekannt, dass sie die Reifung von mDC einschließlich der Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Aktivierung naiver T-Zellen fördern^{6, 28, 44 - 48}. Als Inhibitoren der Differenzierung von Monozyten in mDC wurden Imatinib (STI 571), IL-10 und Troglitazone (TGZ) verwendet und vom ersten Tag an mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 dem Kulturmedium zugegeben^{49 - 53}. Die Zellen wurden nach sieben Tagen geerntet und Proteinlysate hergestellt. Da die TLR-Liganden, TGZ und STI 571 in DMSO gelöst waren, wurden auch die übrigen Zellen mit gleichen Mengen an DMSO versetzt, um den Effekt des Lösungsmittels zu kontrollieren.

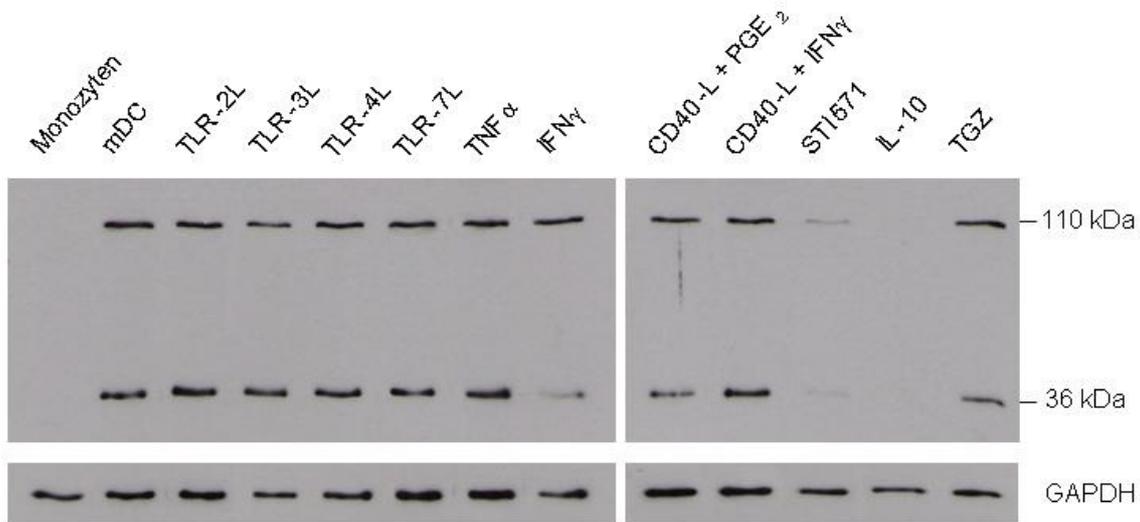


Abbildung 19: Regulation der Genexpression von p306.

Western Blot von mDC mit den Stimulatoren der DC-Reifung TLR-2L (5 $\mu\text{g/ml}$), TLR-3L (50 $\mu\text{g/ml}$), TLR-4L (100 ng/ml), TLR-7L (2 $\mu\text{g/ml}$), $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml), $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml), CD40-L (100 ng/ml) mit PGE_2 (1 $\mu\text{g/ml}$), CD40-L (100 ng/ml) mit $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml) und den Inhibitoren der DC-Differenzierung STI 571 (3 $\mu\text{g/ml}$), IL-10 (10 ng/ml), TGZ (5 μM). Je 20 μg Protein wurden für die SDS-PAGE verwendet und der Anti-P306 AK in der Verdünnung 1:500 als Erstantikörper im Western Blot eingesetzt. Zum Vergleich sind Monozyten und unreife mDC aufgeführt. Alle Proben sind mit gleichen Mengen DMSO versetzt. Kontrolle mit GAPDH.

Diejenigen dendritischen Zellen, die mit den verschiedenen *Toll-like* Rezeptor-Liganden, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und dem CD40-Liganden mit $\text{IFN}\gamma$ oder PGE_2 stimuliert worden waren, wiesen keine vermehrte Expression des Proteins auf. Für $\text{IFN}\gamma$ alleine wurde eine relative Abschwächung der kleinen gegenüber der großen Bande beobachtet. Hingegen ließ sich die Expression durch die Zugabe von Imatinib weitgehend und durch IL-10 praktisch vollständig unterdrücken. Troglitazone, ein synthetischer, hoch affiner PPAR- γ -Agonist, schien keinen inhibitorischen Effekt zu haben.

4.6 Untersuchung der Genexpression von p306 in makrophagenähnlichen Zellen

Makrophagenähnliche Zellen ließen sich durch siebentägige Inkubation von adhärennten Monozyten einerseits mit und andererseits ohne Zusatz von GM-CSF generieren. Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet und RNA- und Proteinlysate für die anschließende PCR-Analyse und den Western Blot hergestellt.

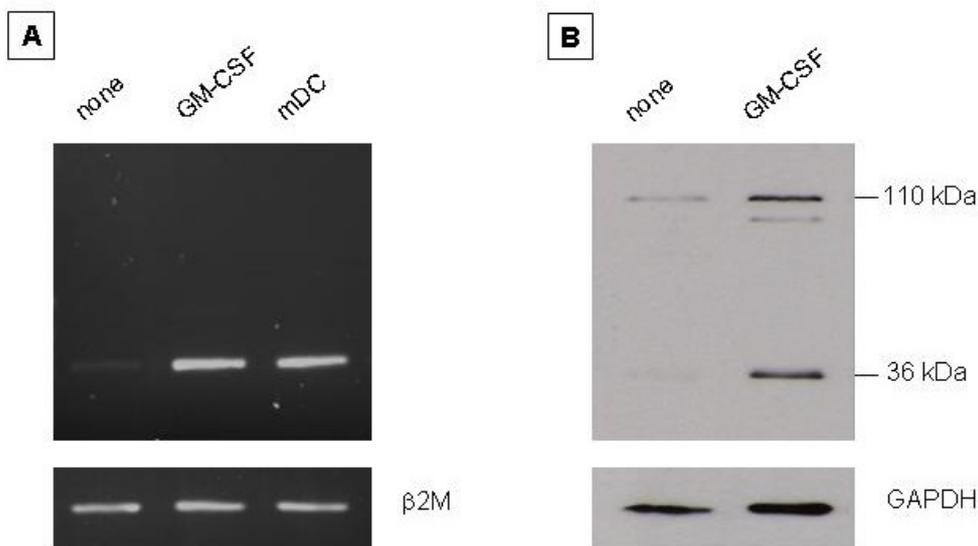


Abbildung 20: Genexpression von p306 in makrophagenähnlichen Zellen.

A: RT-PCR von makrophagenähnlichen Zellen ohne (*none*) und mit Inkubation mit GM-CSF im Vergleich zu mDC mit Primerpaar F0/R0. Je 100 ng RNA wurde in die cDNA-Synthese eingesetzt und je 1 μ l der cDNA für die PCR mit initialem *Touchdown* und 30 Zyklen nach Protokoll verwendet. Kontrolle mit β 2-Mikroglobulin.

B: Western Blot von makrophagenähnlichen Zellen ohne (*none*) und mit Inkubation mit GM-CSF. Für die SDS-PAGE und den Western Blot wurden je 15 μ g Protein und der Erstantikörper Anti-P306 AK in der Verdünnung 1:500 verwendet. Kontrolle mit GAPDH.

Obwohl sich die makrophagenähnlichen Zellen, die ohne Zusatz von GM-CSF generiert worden waren, laut FACS-Analyse kaum vom Phänotyp derjenigen Zellen unterschieden, die mit GM-CSF inkubiert worden waren, wiesen sie

bezüglich der Genexpression von p306 Unterschiede auf. Demnach ließ sich die Genexpression auf mRNA- und Proteinebene durch die Zugabe von GM-CSF stimulieren, während die alleinige Inkubation im RP10-Medium zu keiner entscheidenden Hochregulation der Genexpression führte.

4.7 Untersuchung der differentiellen Genexpression von p306 in anderen Zelllinien

Nach dem Nachweis der differentiellen Genexpression in *Monocyte-derived Dendritic Cells*, sollten auch aus $CD34^+$ Progenitorzellen generierte dendritische Zellen und in-vivo vorkommende dendritische Zellen untersucht werden. Dabei wurden die aus dem peripheren Blut isolierten *Blood DC* und die beiden Subpopulationen, plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen, betrachtet. Die $BDCA-4^+$ Zellen repräsentierten die plasmazytoiden DC, während die myeloiden DC durch die $CD1c^+$ Zellen vertreten wurden. Außerdem wurde die Genexpression in T- und B-Lymphozyten untersucht.

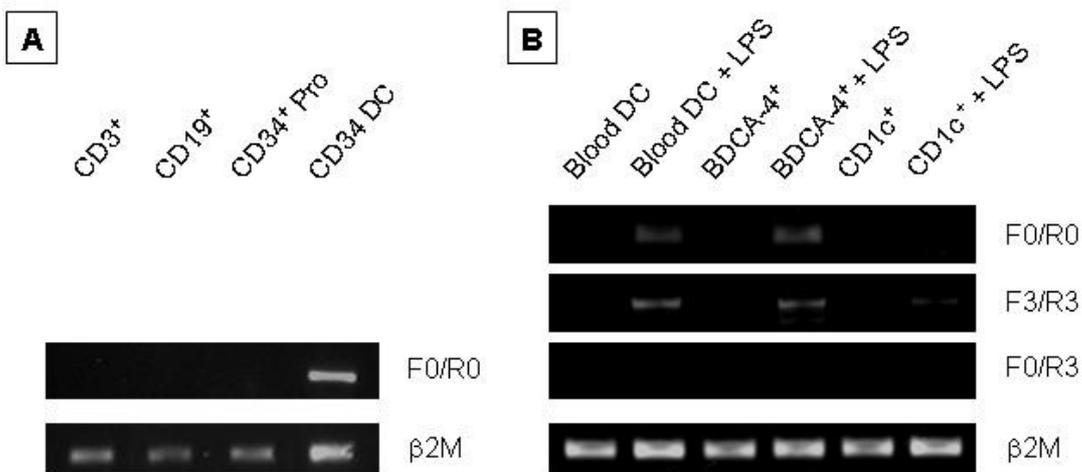


Abbildung 21: Genexpression von p306 in verschiedenen Zellpopulationen in-vitro und in-vivo.

A: RT-PCR von $CD3^+$ T-Zellen, $CD19^+$ B-Zellen, $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläufern ($CD34^+$ Pro) und $CD34^+$ cell-derived DC ($CD34$ DC) mit Primerpaar F0/R0. Je 40 ng RNA wurden in die cDNA-Synthese eingesetzt und je 2 μ l cDNA für die PCR mit

initialem *Touchdown* und 32 Zyklen nach Protokoll verwendet. Kontrolle mit $\beta 2$ - Mikroglobulin.

B: RT-PCR der in-vivo vorkommenden Blood DC und deren beiden Subpopulationen plasmazytoide BDCA-4⁺ DC und myeloide CD1c⁺ DC mit den Primerpaaren F0/R0, F3/R3 und F0/R3. Die entsprechend markierten Zellen wurden mit LPS (100 ng/ml) über 24 Stunden inkubiert. Je 80 ng RNA wurden in die cDNA-Synthese eingesetzt und je 1 μ l cDNA für die PCR mit initialem *Touchdown* und 32 Zyklen nach Protokoll verwendet. Kontrolle mit $\beta 2$ -Mikroglobulin.

Das p306-Gen wurde in den aus CD34⁺ Vorläuferzellen generierten dendritischen Zellen, aber nicht in den CD34⁺ Progenitorzellen selbst exprimiert. Ebenso wenig kam es in T- und B-Lymphozyten vor. Bei der Betrachtung der in-vivo vorkommenden dendritischen Zellen zeigte sich, dass das Gen in der heterogenen Population der *Blood DC* nach Aktivierung mit LPS exprimiert wurde. Dies galt jedoch nicht für die RT-PCR mit dem Primerpaar F0/R3. Darüber hinaus stellte sich bei der Auftrennung in die beiden DC-Subpopulationen heraus, dass beide bekannten Spleißvarianten RNA I und II des Gens p306 vor allem in plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert wurden. In den CD1c⁺ myeloiden dendritischen Zellen ließ sich lediglich für das Primerpaar F3/R3 ein Produkt vergleichsweise gering amplifizieren.

4.8 Analyse der Proteineigenschaften von P306

Mittels umfangreicher Datenbankrecherchen waren im Vorfeld dieser Arbeit die cDNA-Sequenzen AK058145 und NM_145018 als Träger der ursprünglichen EST-Sequenz des p306 Gens identifiziert worden. Nach der Übersetzung der Nukleotid- in die entsprechende Aminosäuresequenz, ließen sich mit Hilfe statistischer Vorhersageprogramme Aussagen zum hypothetischen Protein P306 machen. Angewendet wurden die Programme *PredictProtein* (Columbia University Bioinformatics Center)⁵⁴ und *Sosui* (Tokio University of Agriculture and Technology)⁵⁵, die eine hydrophile, globuläre Proteinstruktur ermittelten und in P306a zwei und in P306b acht mögliche N-Glykosylierungsstellen neben mehreren Phosphorylierungsstellen erkannten. Für die gemeinsame Anfangssequenz der Proteinisoformen wurde vom Programm *NCBI Conserved Domain*

*Search*⁵⁶ eine Übereinstimmung mit dem Zink-Finger-Motiv enthaltenden C-Terminus von RPA1, einer Untereinheit des ssDNA bindenden Kernproteins RPA, angegeben. Das *replication protein A* (RPA) besitzt als Heterotrimer neben der großen 70 kDa Untereinheit RPA1 eine 32 kDa und eine 14 kDa Untereinheit und insgesamt 6 konservierte DNA-Bindungsdomänen, mit denen es an der DNA-Rekombination, -Replikation und -Reparatur beteiligt ist⁵⁷.

5 Diskussion

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden, T-Zell stimulierenden Zellen unseres Immunsystems und verknüpfen die angeborene mit der erworbenen Immunität auf vielfältige Weise. Ihr komplexes Wirkspektrum ist auf die differentielle Expression und Regulation spezifischer Gene in den jeweiligen Subpopulationen und Reifestadien der DC zurückzuführen. In den letzten Jahren hat dementsprechend die Erforschung differentiell exprimierter DC-assoziiierter Gene zunehmend an Bedeutung gewonnen. Neben *DNA Microarrays* und *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) hat sich dabei die cDNA Subtraktion als hocheffiziente Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gene etabliert⁵⁸⁻⁶⁸. Wir hoffen durch unsere Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der DC-abhängigen Immunität zu leisten.

5.1 Nachweis der differentiellen Expression des Gens p306 in mDC mittels RT-PCR und Untersuchungen zum alternativen Spleißen

In den Experimenten mittels RT-PCR konnte mehrfach und eindeutig gezeigt werden, dass das Gen p306 nicht in Monozyten sondern in den aus Monozyten generierten dendritischen Zellen differentiell exprimiert wurde. Für die Untersuchungen mit den Primerpaaren F0/R0, F1/R1, F2/R2, F3/R3 und F3/R2 stimmten die Ergebnisse der PCR-Analysen mit den zuvor berechneten Größen der jeweiligen PCR-Produkte überein, die an Hand der bekannten Nukleotidsequenzen von Primern, cDNA I und cDNA II ermittelt worden waren. Allerdings war gemäß der ursprünglichen Modelvorstellung von der Verteilung der Exons und Primerbindungsstellen für das Primerpaar F0/R3 kein PCR-Produkt vorher-

gesagt worden. Der Umstand, dass dennoch ein spezifisches, etwa 1000 bp langes PCR-Produkt amplifiziert wurde, lässt sich am wahrscheinlichsten dadurch erklären, dass eine cDNA-Sequenz aus mRNA synthetisiert wurde, die sowohl das alternative Exon 3 als auch das Exon 7 in voller Länge enthielt. Unter der Annahme einer dritten Spleißvariante mRNA III, die sich aus den Exons 1-7 zusammensetzt, lässt sich für das Primerpaar F0/R3 mit Hilfe der bekannten Nukleotidsequenzen entsprechend ein PCR-Produkt von 1002 bp berechnen. Folglich muss das eingangs vorgeschlagene Model vom alternativen Spleißen um eine weitere, dritte Spleißvariante mRNA III erweitert werden. Die Annahme dieser dritten Spleißvariante hat allerdings weder Auswirkungen auf die PCR-Produkte anderer Primerpaare noch auf die Synthese der beiden Proteinisoformen, da das Start-Codon in Exon 4 liegt. Die der mRNA III entsprechende cDNA-Sequenz ist bislang nicht in öffentlichen cDNA-Bibliotheken eingetragen. Das entsprechend überarbeitete Model der Primerbindungs- und Spleißstellen ist im Folgenden dargestellt.

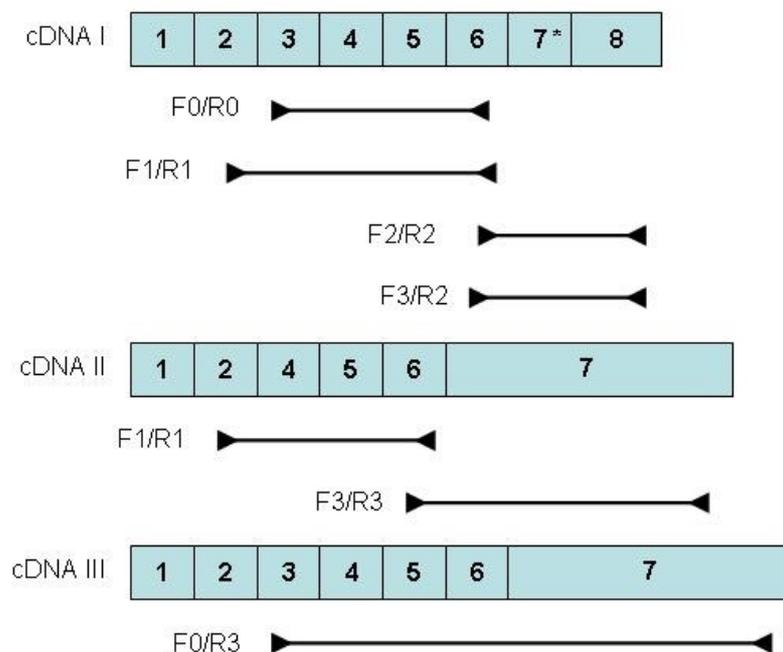


Abbildung 22: Überarbeitetes Model der Primerbindungsstellen.

Aufgeführt sind die verschiedenen Primerpaare F0/R0, F1/R1, F2/R2, F3/R3, F3/R2 und F0/R3 sowie die cDNA III -Sequenz, die einer dritten, neuen Spleißvariante

mRNA III entspricht. Die neue Spleißvariante mRNA III enthält die Exons 1 - 7. In dieser Zusammensetzung lässt sich für das Primerpaar F0/R3 ein PCR-Produkt der Länge 1002 bp amplifizieren.

Von besonderem Interesse ist auch das Ergebnis der RT-PCR mit dem Primerpaar F1/R1. Hier müssten laut Model zwei Banden abgebildet sein, ein kurzes PCR-Produkt von 221 bp amplifiziert am *Template* cDNA II und ein langes PCR-Produkt von 443 bp amplifiziert an den *Templates* cDNA I und cDNA III. In der durchgeführten PCR-Analyse ist die längere Bande von etwa 443 bp wesentlich schwächer abgebildet als die kurze Bande von etwa 221 bp. Dennoch lässt sich aus diesem Ergebnis nicht automatisch schließen, dass die beiden Spleißvarianten mRNA II und mRNA III verhältnismäßig seltener vorkommen als die Variante mRNA I. Eine sehr viel wahrscheinlichere Erklärung für dieses Ungleichgewicht ist, dass während der PCR mit den eingestellten Parametern kurze Sequenzen gegenüber längeren bevorzugt amplifiziert werden. Darüber hinaus gilt, dass sich mit der einfachen RT-PCR keine genauen quantitativen Aussagen machen lassen. Letztendlich zeigt sich im Western Blot, dass beide Proteinisoformen in unstimulierten mDC konsekutiv in etwa gleichem Ausmaß synthetisiert werden.

5.2 Nachweis der differentiellen Expression des Gens p306 in mDC mittels Western Blot

Es konnte gezeigt werden, dass ein vom Gen p306 codiertes Protein P306 wiederum in mDC differentiell synthetisiert wurde. Die Western Blot-Untersuchungen der meisten Proteinlysate von mDC zeigten zwei Banden, die Proteinen der molaren Masse von etwa 36 kDa und 110 kDa entsprachen. Ausgehend von der Vorstellung des alternativen Spleißens ist davon auszugehen, dass dieses charakteristische Bandenmuster auf zwei Proteinisoforme P306a und P306b zurückzuführen ist. Allerdings ergibt sich zumindest für die kleinere Isoform P306a eine Diskrepanz zwischen dem an Hand der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von etwa 20 kDa und dem experimentell ermittelten Wert von etwa 36 kDa. Für diese Abweichung können mehrere Erklärungsversuche herangezogen werden. Eine Möglichkeit besteht

darin, dass das Protein posttranslational modifiziert wird. Eine der häufigsten Modifikationen ist dabei die Glykosylierung, die überwiegend im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat stattfindet und lösliche wie auch membrangebundene Proteine betrifft. Man unterscheidet eine N-Glykosylierung von einer weniger häufigeren O-Glykosylierung. Bei der N-Glykosylierung wird ein vorgefertigtes, aus insgesamt 14 Monosacchariden aufgebautes Oligosaccharid im Endoplasmatischen Retikulum mit der freien Aminogruppe in einer Asparaginseitenkette verknüpft. Dabei werden nur Asparaginreste ausgewählt, die in der Sequenzfolge Asparagin – X – Serin (NXS) oder Asparagin – X – Threonin (NXT) vorkommen, wobei mit X jede Aminosäure außer Prolin gemeint ist. Entsprechende Erkennungssequenzen finden sich zweimal in P306a und achtmal in P306b. Im ER werden gegebenenfalls wieder einige Glucose- und Mannosereste abgetrennt und die entstandenen Glykoproteine an den Golgi-Apparat weitergeleitet. Hier können weitere Zuckerreste abgetrennt oder angefügt werden, darunter auch Sialinsäure-, Galaktose- und Fruktose-^{41, 42}. Die O-Glykosylierung findet andererseits größtenteils im Golgi-Apparat statt und beginnt in wenigen Fällen im ER. Meist wird zunächst ein N-Acetylgalactosaminrest an die Hydroxylgruppen von Serin, Threonin oder Hydroxylysin angefügt und anschließend mehrere Zuckerreste nacheinander an die bereits gebundenen Zuckerreste angebaut. O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten sind meist kürzer als die zuweilen stark verzweigten N-glykosidisch verbundenen Oligosaccharide⁴². In sehr seltenen Fällen sind zytosolische Proteine glykosyliert. Meist ist nur ein einzelner N-Acetylglucosaminrest O-glykosidisch an Serin oder Threonin gebunden⁴¹. Berücksichtigt man die große Differenz von etwa 12 000 Da zwischen ermitteltem und berechnetem Molekulargewicht, müsste man folglich von komplexen Kohlenhydratketten im Sinne der N-Glykosylierung ausgehen. Alternative Modifikationen wie Phosphorylierungen und Sulfatierungen sind sicherlich möglich und wahrscheinlich, können aber nicht in vergleichbarer Weise die Diskrepanz im Molekulargewicht erklären. Eine Verbindung des neu synthetisierten Proteins mit einer schweren hydrophoben, lipidhaltigen Kette erscheint angesichts des löslichen und globulären Charakters von P306 unwahrscheinlich. Die Protein-

isoform P306b scheint zumindest vom Molekulargewicht her mit der großen 110 kDa Bande übereinzustimmen. Dennoch sind bei dieser Größenordnung Glykosylierungen nicht auszuschließen, da sie anteilmäßig weniger ins Gewicht fallen und nur einen relativ geringen Höhenunterschied im zwölfprozentigen Trenngel verursachen könnten. Es muss auch in Erwägung gezogen werden, dass das vorgestellte Model vom alternativen Spleißen des Gens p306 (Abbildung 1) zumindest für die kleine Isoform P306a nicht vollständig zutrifft. Beispielsweise könnte bedingt durch alternative Spleißstellen in Exons der offene Leserahmen tatsächlich länger ausfallen als der an Hand der Sequenz von mRNA I errechnete, ohne zwingendermaßen die Ergebnisse der PCR-Analyse mit den verschiedenen Primerpaaren beeinflussen zu müssen. Ein alternativer Erklärungsansatz geht davon aus, dass möglicherweise lediglich die schwere Isoform P306b tatsächlich synthetisiert beziehungsweise P306a als funktionsunfähiges Protein sofort abgebaut wird. Nach den PCR-Untersuchungen mit den verschiedenen Primerpaaren und dem Nachweis des alternativen Spleißens, gilt zumindest die Synthese von drei verschiedenen mRNA-Spleißvarianten als sicher. Allerdings kann, wie zuvor bereits erläutert wurde, mit den durchgeführten Versuchen nicht auf das tatsächlich vorliegende Mengenverhältnis zwischen den drei Spleißvarianten geschlossen werden. Darüber hinaus kann auch keine Aussage über die Stabilität der mRNAs im Zytosol gemacht werden, so dass es möglicherweise nicht zur relevanten Translation der kurzen Spleißvariante kommen könnte. Vor diesem Hintergrund könnte die kleine 36 kDa Bande auf ein proteolytisches Spaltprodukt der schweren Isoform P306b zurückzuführen sein. Die größte Bande von etwa 150 kDa könnte auf die Dimerisierung der 36 kDa und 110 kDa schweren Proteine zurückgeführt werden. Gleichermäßen lässt sich die etwa 75 kDa große Bande durch ein Dimer der kleinen 36 kDa schweren Fragmente erklären. Alternativ könnte es sich auch um ein proteolytisches Spaltprodukt der schweren Isoform P306b handeln. Dass bei den vier beschriebenen, differentiell exprimierten Banden im Western Blot von spezifischen Banden auszugehen ist, wurde durch die Blockierung des Erstantikörpers Anti-P306 mit dem Immunisierungspeptid sichergestellt. Bei polyklonalen Antikörpern besteht prinzipiell die Gefahr, dass

neben den gesuchten Antigenen auch andere unspezifische Epitope erkannt werden. Durch eine Vorinkubation des Erstantikörpers mit dem Immunisierungspeptid im Überschuss werden alle spezifischen Antikörperbindungsstellen abgedeckt. Der Erstantikörper kann somit nur noch über freie, nicht P306-spezifische Bindungsstellen an die transferierten Proteine binden. In unserem Fall ließen sich mit dem geblockten Antikörper keine Banden für mDC abbilden. Entsprechend kann man annehmen, dass alle Banden, die durch den ungeblockten Anti-P306-AK dargestellt werden, P306-spezifisch sind. Allerdings lässt sich nicht mit Sicherheit ausschließen, dass der Erstantikörper nicht nur monospezifische Bindungsstellen aufweist und etwaige alternative Bindungsstellen trotzdem im Immunkomplex aus Erstantikörper und Immunisierungspeptid verlegt sind. In diesem Fall würde der Western Blot mit der Erstantikörperblockierung ebenfalls kein Bandenmuster zeigen, während der ungeblockte Erstantikörper, wie er in den übrigen Versuchen zum Einsatz kam, auch unspezifische Banden markieren könnte. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es sich bei den 36 kDa und 110 kDa Banden wahrscheinlich um die Proteinisoformen P306a und P306b handelt, die durch Dimerisierung auch eine 75 kDa beziehungsweise 150 kDa Bande im Western Blot hervorrufen können. Das Vorkommen unspezifischer Banden oder mehrerer proteolytischer Spaltprodukte kann allerdings nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

5.3 Kinetik der p306-Genexpression

Die Untersuchungen zur Kinetik zeigten, dass die Expression der Spleißvarianten mRNA I und mRNA II innerhalb eines Tages und die Spleißvariante mRNA III nach etwa zwei Tagen hochreguliert wurde. Die exemplarische Untersuchung der Expression der Spleißvariante mRNA I in einer Stundenkinetik ergab eine starke Hochregulation nach etwa 18 Stunden. Auch auf der Proteinebene wurden beide Isoformen innerhalb eines Tages exprimiert. Das Gen p306 wurde während der Differenzierung von Monozyten in mDC offensichtlich sehr frühzeitig durch IL-4 und GM-CSF induziert. Dass es sich bei der Expression nicht um ein Kultivierungsartefakt handelte, konnte durch die

siebtägige Inkubation von Monozyten in RP10-Medium ohne Zusatz von Zytokinen gezeigt werden, die nicht zu einer p306-Genexpression geführt hatte.

5.4 Stimulation und Repression der p306-Genexpression

Zur Untersuchung der Regulation des Gens p306 wurden dendritische Zellen aus Monozyten eines Spenders generiert und mit den *Toll-like* Rezeptor-Liganden TLR-2L (Pam3Cys), TLR-3L (Poly I:C), TLR-4L (LPS) und TLR-7L (Imiquimod), mit TNF α , IFN γ , CD40-Ligand mit PGE $_2$ und CD40-Ligand mit IFN γ stimuliert. Allerdings ließ sich die Expression des Proteins P306 im Vergleich zu unreifen, unstimulierten mDC durch die genannten Substanzen bis auf eine Ausnahme nicht beeinflussen. Lediglich bei IFN γ -behandelten DC konnte eine Veränderung im Verhältnis der Expressionen der Spleißvarianten beobachtet werden, die auf eine IFN γ -bedingte Regulation des alternativen Spleißens zugunsten der 110 kDa Isoform zurückführbar ist. Allerdings ließ sich dieser Effekt nicht mehr nachweisen, wenn mDC mit CD40-L und IFN γ gemeinsam stimuliert wurden. Eine Aktivierung von dendritischen Zellen durch CD40-L und IFN γ gemeinsam ist durch reife T $_H$ 1-Zellen vorstellbar, während NK-Zellen die DC-Reifung über IFN γ und TNF α fördern⁶⁹. Insgesamt scheint das Gen p306 nicht durch die Reifung von mDC verstärkt exprimiert zu werden. In-vivo jedoch wurde p306 in aus dem peripheren Blut isolierten *Blood DC* lediglich nach deren Aktivierung durch LPS exprimiert.

Als mögliche Inhibitoren der Zelldifferenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen wurden Imatinib (STI 571), IL-10 und Troglitazone (TGZ) eingesetzt. Vergleicht man die Wirkung dieser drei Inhibitoren auf sich differenzierende mDC, so bewirkt IL-10, wenn es vom ersten Tag der Inkubation an mit IL-4 und GM-CSF zugegeben wird, dass sich die Monozyten nicht in dendritische Zellen, sondern in makrophagenähnliche CD14 $^+$ CD1a $^-$ CD83 $^-$ Zellen entwickeln^{47, 51, 70}. Im Gegensatz dazu entwickeln sich Monozyten bei Zugabe sowohl von STI 571 als auch von TGZ zu vitalen CD14 $^-$ Zellen, die morphologisch dendritischen Zellen ähneln. Phänotypisch und funktionell unterscheiden sie sich jedoch stark von normalen mDC. Die Marker CD1a und

CD80 sind vergleichsweise herunterreguliert, während der Marker CD86 hochreguliert ist. Außerdem sind die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen verändert und die Fähigkeit zur Stimulation antigenspezifischer T-Zellen unabhängig von der verminderten IL-12 Sekretion stark gehemmt^{49, 71, 72}. Die selektive Hemmbarkeit von p306 durch IL-10 und STI 571 könnte auf einen möglichen gemeinsamen Signaltransduktionsweg zurückzuführen sein. Von allen drei Inhibitoren ist beispielsweise bekannt, dass sie genregulatorische Effekte zumindest teilweise über eine Hemmung von NF- κ B Transkriptionsfaktoren ausüben^{50, 73, 74}. Die NF- κ B Proteine bleiben dabei großteils in ihrer inaktiven Form an den inhibitorischen I κ B Proteinen im Zytosol gebunden. Die Aktivierung von NF- κ B in mDC wird unter anderem über die Signalwege der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) reguliert. Während der spezifische bcr/abl-Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib die Phosphorylierung der p38 und p42/44 MAPK stimuliert, wird diese durch IL-10 gehemmt^{73, 75 - 77}. Andererseits hemmen sowohl Imatinib als auch IL-10 die Phosphorylierung der Akt-Kinase im PI3-K Signalweg^{73, 78}. Der PPAR- γ -Agonist Troglitazone hingegen hat keinen Einfluss auf die Akt-Kinase und hemmt die Aktivierung der p38 und p42/44 MAPK^{50, 72, 79}. Letztendlich ist die Regulierbarkeit der Genexpression ein starker Hinweis für eine spezifische Funktion von p306 in der Immunantwort dendritischer Zellen. Diese Behauptung wird insbesondere durch die Hochregulation der Expression von p306 in *Blood DC* nach deren Aktivierung durch LPS gestützt.

5.5 Vorkommen der p306-Genexpression in verschiedenen Zelltypen

Obwohl die Auswahl des Gens p306 lediglich auf der Suche nach differentiell exprimierten Genen in *Monocyte-derived Dendritic Cells* beruhte, war natürlich die Frage nach anderen Zelltypen, die p306 exprimieren könnten, von großem Interesse. Dazu wurden zunächst aus CD34⁺ Vorläuferzellen generierte dendritische Zellen, aber auch ex-vivo generierte makrophagenähnliche Zellen untersucht. Für die CD34⁺ Progenitoren und die CD34 DC ergab sich dasselbe Expressionsmuster wie für Monozyten und mDC. Makrophagenähnliche Zellen wurden auf zwei Arten generiert, zum einen mit und zum anderen ohne

Inkubation mit GM-CSF. Obwohl sich beide Zellgruppen phänotypisch ähnelten, exprimierte nur die mit GM-CSF kultivierte Population das Gen, wobei festzuhalten ist, dass der Anteil an CD14⁺ HLA-DR⁺ makrophagenähnlichen Zellen in der GM-CSF-Population viel höher war. Bei der hohen Sensitivität der RT-PCR wäre allerdings auch eine etwaige geringe Expression von p306 in den ohne GM-CSF generierten Zellen nicht unentdeckt geblieben. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei der differentiellen Genexpression nicht um einen zeitlichen oder durch das Medium bedingten Kultivierungseffekt handelt. Dass sich die Expression durch GM-CSF allein induzieren lässt, könnte darauf hinweisen, dass P306 auch in anderen antigenpräsentierenden Zellen wie den Makrophagen vorkommt. Viel interessanter war allerdings die Frage, ob das Gen p306 auch in dendritischen Zellen und Lymphozyten in-vivo exprimiert wurde. Während sich in unreifen T- und B-Lymphozyten keine entsprechende mRNA fand, exprimierten die aus dem peripheren Blut isolierten dendritischen Zellen (*Blood DC*) nach deren Aktivierung durch LPS das Gen p306. Dies galt allerdings nicht für die neue Spleißvariante mRNA III. Da es sich bei den *Blood DC* um eine heterogene Zellpopulation handelt, wurden die beiden großen Subpopulationen, myeloide (CD11c⁺) und plasmazytoide (CD11c⁻ CD123⁺ BDCA-2⁺ BDCA-4⁺) dendritische Zellen, getrennt untersucht. Stellvertretend für die myeloiden DC wurde die Hauptpopulation von CD11c⁺ CD123^{low} BDCA-1⁺ (CD11c⁺) DC betrachtet ⁸⁰. Die aktivierten plasmazytoiden BDCA-4⁺ DC exprimierten p306 in Form beider Spleißvarianten mRNA I und II, während die aktivierten myeloiden BDCA-1⁺ (CD11c⁺) DC eine vergleichsweise schwache Expression lediglich der Spleißvariante mRNA II zeigten. Myeloide und plasmazytoide DC unterscheiden sich in Morphologie, Lebenszyklus und dem Expressionsmuster einer Vielzahl von spezifischen Oberflächenmolekülen und Zytokinen. Eindruckvollstes Beispiel ist die Typ I Interferonproduktion nach viraler Stimulation, die die plasmazytoiden DC in ihrer zentralen Rolle vor allem für die antivirale Immunantwort auszeichnet. Beide DC-Typen regulieren in einem komplexen Wechselspiel die adaptive Immunantwort, indem sie eine T_H1- oder T_H2-Polarisation, die CTL- und B-Zellaktivierung, die Immunglobulinausschüttung und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses

beeinflussen. Man darf gespannt sein, welche Rolle dabei das differentiell exprimierte Gen p306 in dendritischen Zellen einnimmt.

5.6 Ausblick

Mit dem Nachweis der differentiellen Genexpression in in-vitro wie in-vivo generierten dendritischen Zellen und der Charakterisierung der Expression durch die Untersuchung der Kinetik und der Regulation durch äußere Stimuli sind die Grundvoraussetzungen dafür geschaffen, das Gen p306 insbesondere auf seine Funktion hin zu untersuchen. Dazu werden Versuche mit *short interfering RNA* (siRNA) folgen, die die Expression des Gens spezifisch ausschalten und damit die Untersuchung funktioneller Konsequenzen für Zellstruktur, Oberflächenexpression, Zytokinausschüttung, Migration, Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulierung ermöglichen. Der Vollständigkeit halber soll durch Sequenzierung der verschiedenen PCR-Produkte für die jeweiligen Primerpaare das vorgestellte Model bezüglich der drei Spleißvarianten verifiziert werden und die cDNA-Sequenz III der neu entdeckten dritten Spleißvariante in die NCBI-Datenbank eingetragen werden. Die Hypothese der Glykosylierung des Proteins P306 ließe sich eventuell durch den Einsatz von Glykosylierungsinhibitoren überprüfen. Ebenso wird es mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers vielleicht möglich werden, das exprimierte Protein P306 intrazellulär zu lokalisieren. Die Analogie zu Teilen des ssDNA bindenden Kernproteins RPA ist ein Hinweis darauf, dass es sich auch bei P306 um ein Kernprotein handeln könnte. Wir erhoffen uns von den weiteren Untersuchungen grundsätzlich neue Erkenntnisse über die Funktion vor allem plasmazytoider dendritischer Zellen.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Untersuchung differentiell exprimierter DC-assoziiertes Gene neue Einblicke in die komplexe Funktion und Heterogenität dendritischer Zellen zu gewinnen. Mittels cDNA-Subtraktion, RT-PCR-Analyse und *Western Blotting* ist es gelungen das in *monocyte-derived*

DC differentiell exprimierte Gen p306 zu identifizieren und sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachzuweisen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass p306 nicht nur in in-vitro generierten dendritischen Zellen, sondern vor allem auch in plasmazytoiden DC in-vivo exprimiert wird. Die theoretischen Analysen der mRNA-Sequenz und der Proteinstruktur und -eigenschaften ergaben, dass p306 wahrscheinlich für zwei Isoformen eines hydrophilen, globulären Proteins codiert, welches Analogien zu Teilen des ssDNA bindenden Kernproteins RPA aufweist. Die beiden im *Western Blot* sichtbaren Proteinisoformen und die PCR-Analysen mit den verschiedenen Primerkombinationen haben gezeigt, dass das Gen p306 in mDC offensichtlich einem konstitutiven alternativen Spleißen unterliegt und innerhalb der ersten ein bis zwei Tage der Differenzierung in mDC exprimiert wird. Die im *Western Blot* festgestellte Diskrepanz zwischen dem ermittelten und dem im Voraus errechneten Molekulargewicht der P306a Isoform lässt sich beispielsweise durch eine posttranslationale Modifikation wie der Glykosylierung erklären. Die beiden an Hand von Datenbankrecherchen ermittelten möglichen Spleißvarianten müssen jedoch durch eine dritte, bislang unbeschriebene Variante ergänzt werden, um die Ergebnisse der PCR-Analysen erklären zu können. Für ein Vorliegen des alternativen Spleißens spricht des Weiteren die relativ verminderte Expression der kurzen Proteinisoform in mDC als Reaktion auf die Stimulation mit IFN γ und die differentielle Genexpression der Spleißvarianten in den aktivierten Subpopulationen der *Blood DC* in-vivo. Durch die Reifung von mDC lässt sich allerdings die Genexpression von p306 nicht weiter stimulieren. Andererseits haben sich Imatinib und IL-10 als potente Inhibitoren der Expression erwiesen. Troglitazone, das ähnlich wie Imatinib die normale Differenzierung zu dendritischen Zellen inhibiert, hatte wiederum keinen Einfluss auf die Genexpression von p306. Möglicherweise besteht ein gemeinsamer Mechanismus der Signaltransduktion von Imatinib und IL-10, der zur Repression des Gens p306 führt und der bei der Inhibition mit Troglitazone keine Rolle spielt. Beispielsweise hemmen sowohl Imatinib als auch IL-10 die Phosphorylierung der Akt-Kinase im PI3-K Signalweg, während diese von Troglitazone nicht beeinflusst wird. Des Weiteren lassen die regulativen

Einflüsse von IFN γ und IL-10 Raum für Spekulationen über mögliche Feedback-Mechanismen im Rahmen der Polarisation von T-Helferzellen, da IFN γ typischerweise von T_H1- und IL-10 von T_H2-Zellen produziert wird. Alles in allem sind in dieser Arbeit ausreichend Hinweise dafür gewonnen worden, dass das differentiell exprimierte Gen p306 eine wichtige Rolle für die Funktion dendritischer Zellen spielen könnte. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die funktionelle Bedeutung von p306 aufzuklären und damit zum besseren Verständnis dendritischer Zellen beizutragen.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere; Adenosin
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
β2M	β ₂ -Mikroglobulin
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C5aR	Komplementfaktor C5a-Rezeptor
CBP	<i>Cap-binding protein</i>
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster(s) of differentiation</i>
CD40-L	CD40-Ligand
CD34 ⁺ Pro	CD34 ⁺ Vorläuferzellen
CD34 DC	<i>CD34⁺ cell-derived Dendritic Cells</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte(s)</i>
CTLA	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein</i>
DC	dendritische Zelle(n)
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dsDNA	<i>Double-stranded deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIFs	Eukaryotische Initiationsfaktoren
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
et al.	et alii
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
Fc-Fragment	<i>Fragment crystalline</i> der Immunglobuline
FCS	Fötales Kälberserum
FSC	<i>Forward scatter</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLT3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
G	Guanosin
g	Gramm; Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-Diphosphat
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl-)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HEVs	<i>High endothelial venules</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	Interne Ribosomeintrittsstellen
kb	Kilo Basen

RPA	<i>Replication protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut: 1640-Zellkulturmedium</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	<i>Sodium dodecylsulphate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
siRNA	<i>Short interfering ribonucleic acid</i>
snRNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>
snoRNA	<i>Small nucleolar ribonucleic acid</i>
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
ssDNA	<i>Singel-stranded deoxyribonucleic acid</i>
ssRNA	<i>Singel-stranded ribonucleic acid</i>
STI 571	Imatinib
T	Thymin
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween-20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGZ	Troglitazone
T _H 1	T-Helferzellen-1
T _H 2	T-Helferzellen-2
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TLR-L	<i>Toll-like receptor ligand</i>
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRANS	<i>Tumor necrosis factor related activation-induced cytokine</i>
tRNA	<i>Tranfer ribonucleic acid</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit (Einheit); Uracil</i>
V	Volt

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen und Bindungsstellen der Primer	23
Tabelle 2: Geräte.....	24
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 4: Antikörper	28
Tabelle 5: Chemikalien, Nukleotide und Peptide	29
Tabelle 6: Kits.....	32
Tabelle 7: Medien.....	32
Tabelle 8: Zytokine	33
Tabelle 9: Puffer.....	34
Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel in der SDS- PAGE.....	45
Tabelle 11: Mastermixe für PCR	51
Tabelle 12: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von MACS-isolierten Monozyten	56
Tabelle 13: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von mDC	57
Tabelle 14: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von CD34 DC	59
Tabelle 15: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von <i>Blood DC</i>	60
Tabelle 16: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von plasmazytoiden DC.....	61
Tabelle 17: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von myeloiden CD1c ⁺ DC.....	62
Tabelle 18: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von makrophagenähnlichen Zellen mit und ohne Zusatz von GM-CSF	63
Tabelle 19: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von T-Lymphozyten.....	66
Tabelle 20: <i>Panel</i> für FACS-Färbung von B-Lymphozyten.....	67
Tabelle 21: Länge der jeweils zu erwartenden PCR-Produkte in Abhängig- keit von den Primerpaaren und den Spleißvarianten.....	71

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Model des alternativen Spleißens des Gens p306.....	20
Abbildung 2: Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code.....	22
Abbildung 3: FACS-Analyse von MACS-isolierten Monozyten.....	56
Abbildung 4: FACS-Analyse von mDC.....	58
Abbildung 5: FACS-Analyse von CD34 DC.....	59
Abbildung 6: FACS-Analyse von <i>Blood DC</i>	60
Abbildung 7: FACS-Analyse von plasmazytoiden DC.....	61
Abbildung 8: FACS-Analyse von myeloiden CD1c ⁺ DC.....	62
Abbildung 9: FACS-Analyse von makrophagenähnlichen Zellen ohne GM-CSF.....	64
Abbildung 10: FACS-Analyse von makrophagenähnlichen Zellen mit GM-CSF.....	65
Abbildung 11: FACS-Analyse von T-Lymphozyten.....	66
Abbildung 12: FACS-Analyse von B-Lymphozyten.....	67
Abbildung 13: Differentielle Genexpression von p306 in mDC.....	68
Abbildung 14: Western Blot nach Block des Erstantikörpers Anti-P306 AK mit dem Immunisierungspeptid im Vergleich zum ungeblock-ten Erstantikörper.....	70
Abbildung 15: Model der Primerbindungsstellen.....	72
Abbildung 16: RT-PCR mit verschiedenen Kombinationen von Primern.....	73
Abbildung 17: Tageskinetik der Genexpression von p306.....	74
Abbildung 18: RT-PCR-Stundenkinetik mit Primerpaar F0/R0.....	75
Abbildung 19: Regulation der Genexpression von p306.....	77
Abbildung 20: Genexpression von p306 in makrophagenähnlichen Zellen.....	78
Abbildung 21: Genexpression von p306 in verschiedenen Zellpopulationen in-vitro und in-vivo.....	79
Abbildung 22: Überarbeitetes Model der Primerbindungsstellen.....	82

10 Literaturverzeichnis

10.1 Alphabetisches Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Immunologie. Verlag Hans Huber; 1996.

Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG: A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naïve T cells. *Nature*. 1997, 387: 713-717.

Ahn JH, Lee Y, Jeon C, Lee SJ, Lee BH, Choi KD, Bae YS: Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. *Blood*. 2002, 100: 1742-1754.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of The Cell*. 2002.

Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A: IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*. 1998, 28: 349-369.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990, 215: 403-10.

Appel S, Boehmler AM, Grunebach F, Muller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brummendorf TH, Brossart P: Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood*. 2004, 103: 538-544.

Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brummendorf TH, Weinschenk T, Grunebach F, Brossart P: Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic

cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signalling pathways. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 1928-1940.

Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grunebach F, Brossart P: PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood.* 2005, 106: 3888-3894.

Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, Trinchieri G: Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol.* 2001, 2: 1144-1150.

Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998, 392: 245-252.

Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K: Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med.* 2000, 192: F39-44.

Baratelli F, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Zhu L, Escuardro B, Sharma S, Reckamp K, Dohadwala M, Dubinett SM: PGE2 confers surviving-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2005, 78: 555-564.

Bhattacharyya S, Sen P, Wallet M, Long B, Baldwin AS Jr, Tisch R: Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood.* 2004, 104: 1100-1109.

Bianchi G, D'Amico G, Varone L, Sozzani S, Mantovani A, Allavena P: In vitro studies on the trafficking of dendritic cells through endothelial cells and extra-cellular matrix. *Dev Immunol.* 2000, 7: 143-153.

Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ: Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC) 2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000, 192: 1785-1796.

Biere F, Bendriss-Vermare N, Delale T, Burg S, Corbet C, Rissoan MC, Chaperot L, Plumas J, Jacob MC, Trinchieri G, Bates EE: Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol.* 2002, 63: 1081-1083.

Brossart P, Zobywalski A, Grunebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W: Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res* 2000, 60: 4486-4492.

Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F: Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol.* 1997, 27: 756-762.

Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F: Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1997, 27: 1848-1852.

Cao W, Epstein C, Liu H, DeLoughery C, Ge N, Lin J, Diao R, Cao H, Long F, Zhang X, Chen Y, Wright PS, Busch S, Wenck M, Wong K, Saltzman AG, Tang Z, Liu L, Zilberstein A: Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics.* 2004, 5:26.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994, 180: 1263-1272.

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med.* 1996, 184: 695-706.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999, 5: 919-923.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997, 9: 10-16.

Chu S, Holtz M, Gupta M, Bhatia R: BCR/ABL kinase inhibition by imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukaemia CD34+ cells. *Blood.* 2004, 103: 3167-3174.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93: 6025-6030.

Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S: Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 275: 731-738.

Dzionic A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J: BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is an inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med.* 2001, 194: 1823-1834.

Dzionic A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol.* 2002, 63: 1133-1148.

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S: Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002, 20: 621-667.

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ: The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997, 185: 1101-1111.

Grunebach F, Weck MM, Reichert J, Brossart P: Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol.* 2002, 30: 1309-1315.

Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B: Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signaling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Signal.* 2003, 15: 255-267.

Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K: Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 1999, 94: 845-852.

Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S: Sosui: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 1998, 14: 378-379.

Ito T, Amakawa R, Inaba M, Hori T, Ota M, akamura K, Takebayashi M, Miyaji M, Yoshimura T, Inaba K, Fukuhara S: Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol.* 2004, 172: 4253-4259.

Ito T, Wang YH, Liu YJ: Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptors (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol.* 2005, 26: 221-229.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag; 2002.

Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J: Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 2003, 19: 225-234.

Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997, 27: 3135-3142.

Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ: Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 2000, 192: 219-226.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001, 194: 863-869.

Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML: Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998, 161: 2804-2809.

Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML: Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic

cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol.* 1999, 162: 3231-3236.

Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fodor SP: Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques.* 1995, 19: 442-447.

Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M: Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2001, 2: 585-589.

Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23: 275-306.

Lodish H, Baltimore A, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J: *Molekulare Zellbiologie.* Walter de Gruyter. 1996.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN: Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002, 100: 4512-4520.

Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH.: CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33: D192-196.

Marshall AJ, Du Q, Draves KE, Shikishima Y, HayGlass KT, Clark EA: FDC-SP, a novel secreted protein expressed by follicular dendritic cells. *J Immunol.* 2002, 169: 2381-2389.

Molavi B, Chen J, Mehta JL: Cardioprotective effects of rosiglitazone are associated with selective over-expression of type 2 angiotensin receptors and inhibition of p42/44 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006, 291:H687-93.

Nencioni A, Grunebach F, Zobywlaski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P: Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *J Immunol*. 2002, 169: 1228-1235.

Niuro H, Otsuka T, Ogami E, Yamaoka K, Nagano S, Akahoshi M, Nakashima H, Arinobu Y, Izuhara K, Niho Y: MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 250: 200-205.

O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM: Human Blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 1994, 82: 487-493.

Palucka K, Banchereau J: Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol*. 1999, 19: 12-25.

Parmar S, Katsoulidis E, Verma A, Li Y, Sassano A, Lal L, Majchrzak B, Ravandi F, Tallman MS, Fish EN, Plataniias LC: Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in generation of the effects of imatinib mesylate (STI571) in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem*. 2004, 279: 25345-25352.

Pasare C, Medzhitov R: Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*. 2004, 16: 23-26.

Reis e Sousa C: Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*. 2004, 16: 27-34.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ: Reciprocal Control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999, 283: 1183-1186.

Rissoan MC, Duhon T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, de Saint Vis B, Briere F, Bates EE: Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2002, 100: 3295-3303.

Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD: Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1999, 29: 2769-2778.

Rost B, Yachdav G, Liu J: The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res*. 2004, 32: W321-326.

Rouard H, Marquet J, Leon A, Maison P, Haioun C, Copie-Bergman C, Plonquet A, Farcet JP, Delfau-Larue MH : IL-12 secreting dendritic cells are required for optimum activation of human secondary lymphoid tissue T cells. *J Immunother*. 2002, 25: 324-333.

Sallusto F, Lanzavecchia A: Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*. 1999, 189: 611-614.

Schotte R, Rissoan MC, Bendriss-Vermare N, Bridon JM, Duhon T, Weijer K, Briere F, Spits H: The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood*. 2003, 101: 1015-1023.

Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr: Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*. 1999, 274: 31868-31874.

Shortman K, Caux C: Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells*. 1997, 15: 409-419.

Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichi A, Lombardi L, Ravagnani F, Parmiani G, Gianni AM: Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol*. 1995, 23: 1463-1471.

Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997, 159: 4772-2780.

Szabolcs P, Moore MA, Young JW: Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol*. 1995, 154: 5851-5861.

Szabolcs P, Avigan D, Gezelter S, Ciocon DH, Moore MA, Steinman RM, Young JW: Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood*. 1996, 87: 4520-4530.

Takeda K, Akira S: TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004, 16: 3-9.

Tuteja R, Tuteja N: Serial Analysis of Gene Expression: Applications in Human Studies. *J Biomed Biotechnol*. 2004, 2004: 113-120.

Vieira PL, Kalinski P, Wierenga EA, Kapsenberg ML, de Jong EC: Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J Immunol*. 1998, 161: 5245-5251.

Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P: Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol.* 2000, 164: 4507-4512.

Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, Moretta A: NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood.* 2005, 106: 566-571.

Wyka IM, Dhar K, Binz SK, Wold MS: Replication protein A interactions with DNA: differential binding of the core domains and analysis of the DNA interaction surface. *Biochemistry.* 2003, 42 (44): 12909-12918.

Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K: Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol.* 2004, 16: 915-928.

10.2 Numerisches Literaturverzeichnis

- 1 Takeda K, Akira S: TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004, 16: 3-9.
- 2 Pasare C, Medzhitov R: Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol.* 2004, 16: 23-26.
- 3 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: *Immunologie.* Verlag Hans Huber; 1996.
- 4 Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
- 5 Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ: Reciprocal Control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999, 283: 1183-1186.
- 6 Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997, 9: 10-16.
- 7 Palucka K, Banchereau J: Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol.* 1999, 19: 12-25.
- 8 Sallusto F, Lanzavecchia A: Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med.* 1999, 189: 611-614.
- 9 Bianchi G, D'Amico G, Varone L, Sozzani S, Mantovani A, Allavena P: In vitro studies on the trafficking of dendritic cells through endothelial cells and extra-cellular matrix. *Dev Immunol.* 2000, 7: 143-153.
- 10 Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S: Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.*

- 2002, 20: 621-667.
- 11 Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG: A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naïve T cells. *Nature*. 1997, 387: 713-717.
 - 12 Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998, 392: 245-252.
 - 13 O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM: Human Blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 1994, 82: 487-493.
 - 14 Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD: Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1999, 29: 2769-2778.
 - 15 Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ: The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997, 185: 1101-1111.
 - 16 Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, Trinchieri G: Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol*. 2001, 2: 1144-1150.
 - 17 Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M: Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol*. 2001, 2: 585-589.
 - 18 Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichi A, Lombardi L, Ravagnani F, Parmiani G, Gianni AM: Massive ex vivo generation of

functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol.* 1995, 23: 1463-1471.

- 19 Szabolcs P, Moore MA, Young JW: Expansion of immuno-stimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol.* 1995, 154: 5851-5861.
- 20 Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med.* 1996, 184: 695-706.
- 21 Szabolcs P, Avigan D, Gezelter S, Ciocon DH, Moore MA, Steinman RM, Young JW: Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood.* 1996, 87: 4520-4530.
- 22 Shortman K, Caux C: Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells.* 1997, 15: 409-419.
- 23 Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999, 5: 919-923.
- 24 Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K: Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol.* 2004, 16: 915-928.

- 25 Biere F, Bendriss-Vermare N, Delale T, Burg S, Corbet C, Rissoan MC, Chaperot L, Plumas J, Jacob MC, Trinchieri G, Bates EE: Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol.* 2002, 63: 1081-1083.
- 26 Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ: Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 2000, 192: 219-226.
- 27 Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ: Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC) 2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000, 192: 1785-1796.
- 28 Reis e Sousa C: Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol.* 2004, 16: 27-34.
- 29 Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J: BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is an inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med.* 2001, 194: 1823-1834.
- 30 Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol.* 2002, 63: 1133-1148.
- 31 Ito T, Wang YH, Liu YJ: Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptors (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol.* 2005, 26: 221-229.

- 32 Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23: 275-306.
- 33 Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001, 194: 863-869.
- 34 Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J: Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 2003, 19: 225-234.
- 35 Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML: Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998, 161: 2804-2809.
- 36 Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML: Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol.* 1999, 162: 3231-3236.
- 37 Vieira PL, Kalinski P, Wierenga EA, Kapsenberg ML, de Jong EC: Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J Immunol.* 1998, 161: 5245-5251.
- 38 Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P: Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires

- environmental instruction. *J Immunol.* 2000, 164: 4507-4512.
- 39 Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K: Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med.* 2000, 192: F39-44.
- 40 Ito T, Amakawa R, Inaba M, Hori T, Ota M, akamura K, Takebayashi M, Miyaji M, Yoshimura T, Inaba K, Fukuhara S: Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol.* 2004, 172: 4253-4259.
- 41 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of The Cell.* 2002.
- 42 Lodish H, Baltimore A, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J: *Molekulare Zellbiologie.* Walter de Gruyter. 1996.
- 43 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990, 215: 403-10.
- 44 Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994, 180: 1263-1272.
- 45 Rouard H, Marquet J, Leon A, Maison P, Haioun C, Copie-Bergman C, Plonquet A, Farcet JP, Delfau-Larue MH : IL-12 secreting dendritic cells are required for optimum activation of human secondary lymphoid tissue T cells. *J Immunother.* 2002, 25: 324-333.
- 46 Baratelli F, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Zhu L, Escuardro B, Sharma S, Reckamp K, Dohadwala M, Dubinett SM: PGE2 confers surviving-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic

- cells. *J Leukoc Biol.* 2005, 78: 555-564.
- 47 Brossart P, Zobywalski A, Grunebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W: Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res* 2000, 60: 4486-4492.
- 48 Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997, 27: 3135-3142.
- 49 Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brummendorf TH, Weinschenk T, Grunebach F, Brossart P: Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signalling pathways. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 1928-1940.
- 50 Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grunebach F, Brossart P: PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood.* 2005, 106: 3888-3894.
- 51 Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F: Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol.* 1997, 27: 756-762.
- 52 Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F: Human dendritic cell responses to lipopoly-saccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1997, 27: 1848-1852.

- 53 Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997, 159: 4772-2780.
- 54 Rost B, Yachdav G, Liu J: The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32: W321-326.
- 55 Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S: Sosui: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* 1998, 14: 378-379.
- 56 Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH.: CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33: D192-6.
- 57 Wyka IM, Dhar K, Binz SK, Wold MS: Replication protein A interactions with DNA: differential binding of the core domains and analysis of the DNA interaction surface. *Biochemistry.* 2003, 42 (44): 12909-12918.
- 58 Ahn JH, Lee Y, Jeon C, Lee SJ, Lee BH, Choi KD, Bae YS: Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. *Blood.* 2002, 100: 1742-1754.
- 59 Cao W, Epstein C, Liu H, DeLoughery C, Ge N, Lin J, Diao R, Cao H, Long F, Zhang X, Chen Y, Wright PS, Busch S, Wenck M, Wong K, Saltzman AG, Tang Z, Liu L, Zilberstein A: Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics.* 2004, 5:26.

- 60 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93: 6025-6030.
- 61 Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S: Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 275: 731-738.
- 62 Grunebach F, Weck MM, Reichert J, Brossart P: Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol*. 2002, 30: 1309-1315.
- 63 Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K: Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 1999, 94: 845-852.
- 64 Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fodor SP: Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques*. 1995, 19: 442-447.
- 65 Marshall AJ, Du Q, Draves KE, Shikishima Y, HayGlass KT, Clark EA: FDC-SP, a novel secreted protein expressed by follicular dendritic cells. *J Immunol*. 2002, 169: 2381-2389.
- 66 Risoan MC, Duhon T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, de Saint Vis B, Briere F, Bates EE: Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2002, 100: 3295-3303.

- 67 Schotte R, Rissoan MC, Bendriss-Vermare N, Bridon JM, Duhon T, Weijer K, Briere F, Spits H: The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood*. 2003, 101: 1015-1023.
- 68 Tuteja R, Tuteja N: Serial Analysis of Gene Expression: Applications in Human Studies. *J Biomed Biotechnol*. 2004, 2004: 113-120.
- 69 Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, Moretta A: NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood*. 2005, 106: 566-571.
- 70 Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A: IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*. 1998, 28: 349-369.
- 71 Appel S, Boehmler AM, Grunebach F, Muller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brummendorf TH, Brossart P: Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood*. 2004, 103: 538-544.
- 72 Nencioni A, Grunebach F, Zobywalski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P: Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *J Immunol*. 2002, 169: 1228-1235.
- 73 Chu S, Holtz M, Gupta M, Bhatia R: BCR/ABL kinase inhibition by imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukaemia CD34+ cells. *Blood*. 2004, 103: 3167-3174.

- 74 Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr: Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem.* 1999, 274: 31868-31874.
- 75 Parmar S, Katsoulidis E, Verma A, Li Y, Sassano A, Lal L, Majchrzak B, Ravandi F, Tallman MS, Fish EN, Plataniias LC: Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in generation of the effects of imatinib mesylate (STI571) in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem.* 2004, 279: 25345-25352.
- 76 Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B: Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signaling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Signal.* 2003, 15: 255-267.
- 77 Niuro H, Otsuka T, Ogami E, Yamaoka K, Nagano S, Akahoshi M, Nakashima H, Arinobu Y, Izuhara K, Niho Y: MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 250: 200-205.
- 78 Bhattacharyya S, Sen P, Wallet M, Long B, Baldwin AS Jr, Tisch R: Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood.* 2004, 104: 1100-1109.
- 79 Molavi B, Chen J, Mehta JL: Cardioprotective effects of rosigli-tazone are associated with selective over-expression of type 2 angiotensin receptors and inhibition of p42/44 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, 291:H687-93.

- 80 MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN: Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002, 100: 4512-4520.

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter Brossart danke ich für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung dieser Arbeit und die beispiellose Förderung. Ich habe den freundlichen und unkomplizierten Umgang mit ihm und die Zuversicht, die er ausstrahlte, wenn mich der Glaube an das Gelingen der Arbeit verlassen wollte, sehr geschätzt.

Frau Dr. rer. nat. Silke Appel danke ich für die Einführung in die Thematik, die geduldige und persönliche Betreuung und die Erkenntnis, dass genaues wissenschaftliches Arbeiten nicht hoch genug geschätzt werden kann.

Herrn Dr. rer. nat. Markus Weck danke ich für die Einführung in die Methodik der Experimente und dafür, dass er mir ein Vorbild an Ruhe und Gelassenheit in den Wirrungen der Forschung war.

Frau Dipl. biochem. Anita Bringmann danke ich für die intensive Betreuung und Hilfestellung bei den Experimenten und der Auswertung, für die Teilhabe an ihrem immensen Wissensschatz in der Biochemie und Immunologie und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Frank Grünebach danke ich für die vorbereitenden Arbeiten und die Erstellung der cDNA-Subtraktionsdatenbank.

Meinem Kommilitonen und Freund Daniel Kurz danke ich für die tatkräftige und moralische Unterstützung während unseren vielen gemeinsamen Stunden im und außerhalb des Labors.

Den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brossart danke ich für jegliche Hilfe bei meiner Arbeit, für die freundliche Atmosphäre und die kulinarischen Köstlichkeiten in unserer Teeküche.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“ danke ich für die freundliche Aufnahme, die Förderung meiner Arbeit und die zahlreichen Fortbildungsmöglichkeiten.

Meiner Familie danke ich für die liebevolle Erziehung, die Ermöglichung meines Medizinstudiums und die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Werdegangs, ohne die ich heute nicht dort stünde, wo ich bin.

Meiner Freundin Julia Fräulin danke ich für ihre Liebe und Geduld und dafür eine starke, verlässliche Partnerin an meiner Seite zu sein.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ingo Hilgendorf
 Geburtsdatum: 19.07.1981
 Geburtsort: Haifa
 Nationalität: Deutsch

Schulbildung

08/1987 - 07/1991 Eduard-Mörrike-Grundschule, Böblingen
 08/1991 - 06/2000 Otto-Hahn-Gymnasium, Böblingen
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife; Note 1,0

Hochschulbildung

10/2000 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard Karls Universität Tübingen
 09/2002 Ärztliche Vorprüfung; Note 1,0
 08/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Note 2,0
 01/2005 - 06/2005 Auslandsstudium an der Brown Medical School, Providence, Rhode Island, USA
 01/2006 Annahme als Doktorand der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen
 03/2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Note 1,6
 04.05.2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Note 1,0 und Approbation

Berufliche Tätigkeit

Seit 10/2007 Assistenzarzt in der Abteilung Medizin III, Universitätsklinikum Freiburg

Stipendien

09/2003 Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes

- 11/2003 - 11/2005 Doktorandenstipendium und assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs „Zellbiologische Mechanismen Immun-assoziiierter Prozesse“
- 01/2005 - 06/2005 Semesterstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

Publikationen

Hilgendorf I, Kurz D, Bringmann A, Grünebach F, Kanz L, Brossart P: Characterization of dendritic cell-specific genes p275 and p306. *Onkologie*. 2006, 29 (suppl 3): 51-52.