

**Charakterisierung der Oberflächensialylierung von
Dendritischen Zellen und T-Zellen in unterschiedlichen
Funktionszuständen
sowie
Untersuchung der Expression und der biochemischen
Eigenschaften von CD83-Liganden**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2006

**vorgelegt von
Jutta A. Jenner**

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Januar 2006

Dekan:

Prof. Dr. Stefan Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gernot Bruchelt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hansgeorg Probst

Abkürzungen und Synonyme	4
1 Einleitung	7
1.1 Lektine	10
1.1.1 Lektine sind spezifische kohlenhydratbindende Proteine.....	10
1.1.2 C-Typ Lektine.....	10
1.1.3 P-Typ Lektine.....	12
1.1.4 S-Typ Lektine.....	12
1.1.5 I-Typ Lektine	13
1.1.6 Weitere Lektine	13
1.1.7 Siglecs	13
1.2 Kohlenhydrate und Glykosylierung.....	20
1.2.1 Bedeutung der Glykosylierung in der Entwicklung	25
1.2.2 T-Zell-Glykosylierung	26
1.3 Dendritische Zellen (DC).....	31
1.4 Regulatorische T-Zellen	33
1.5 Tumoren und Glykosylierung	36
1.6 CD83.....	38
2 Zielsetzung und Modell	43
3 Material und Methoden	45
3.1 Geräte	45
3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits	46
3.3 Antikörper und Lektine	49
3.4 Verbrauchsmaterialien	50
3.5 Durchflusszytometrische Analyse der Sialylierung von Dendritischen Zellen	51
3.5.1 PBMC-Aufreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation	51
3.5.2 Isolierung von humanen CD14 ⁺ Zellen.....	52
3.5.3 Zellkultur und Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten	52
3.5.4 Durchflusszytometrische Analyse	53
3.6 Durchflusszytometrische Analyse der Sialylierung von humanen T-Zellen .	55
3.6.1 Isolierung der Zellen.....	55
3.6.2 Mixed Lymphocyte Reaction	57
3.6.3 Durchflusszytometrische Analyse	58
3.7 Durchflusszytometrische Analyse von Leukämie-Zelllinien und Tumorzelllinien	59
3.7.1 Zelllinien und Zellkultur	59
3.7.2 Durchflusszytometrische Analyse	60
3.8 Expression von Siglec-7- und CD83-Fusionsprotein.....	60
3.8.1 Zelllinien und Zellkultur	60
3.8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	61
3.8.3 Plasmide	61
3.8.4 Plasmidisolierung.....	63
3.8.5 Agarosegel der Plasmide	65
3.8.6 Konzentrationsbestimmung der DNA	65
3.8.7 Transfektion mit Lipofectamine	66
3.8.8 Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation	66
3.8.9 Isolation des His-Tag-Fusionproteins aus dem Zellkulturüberstand durch Affinitätschromatographie	67
3.8.10 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	68

3.8.11	Schnelle Proteinfärbung nach Coomassie	70
3.8.12	Western Blot	71
3.8.13	Weitere Aufarbeitung von CD83 ^{ext} und Biotinylierung	72
3.8.14	Tetramerisierung mit Streptavidin-PE	73
3.9	Durchflusszytometrische Analyse mit CD83 ^{tet} :SA-PE	75
3.9.1	Probenvorbereitung PBMC, Monozyten und DC	75
3.9.2	Gewebeproben	75
3.9.3	Probenvorbereitung Thymozyten	75
3.9.4	Probenvorbereitung Lymphknoten	76
3.9.5	Durchflusszytometrische Analyse	76
3.10	CD83L-Expression auf T-Zelllinien.....	77
3.10.1	Zellkultur humaner T-Zelllinien.....	77
3.10.2	Apoptoseinduktion mit Staurosporin.....	77
3.10.3	Inhibierung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin	78
3.10.4	Durchflusszytometrische Analyse der CEM-Zellen	78
3.11	Glycan Array	79
3.12	CD83L-Charakterisierung durch Western Blot und ESI-MS.....	79
3.12.1	Western Blot mit lysierten Thymozyten	79
3.12.2	ESI-MS.....	81
4	Ergebnisse.....	82
4.1	Lektinfärbungen	82
4.1.1	Konjugation von MAL II und Ermittlung der optimalen Färbebedingungen für MAL II und SNL.....	82
4.1.2.	Sialylierung auf reifen und unreifen Dendritischen Zellen	83
4.1.2	Sialylierung von PBMC	85
4.1.3	Sialylierung von Oberflächenproteinen auf Tumorzelllinien	92
4.1.4	Sialylierung auf Leukämie-Zelllinien.....	94
4.1.5	Das rekombinante Fusionsprotein Siglec-7.....	95
4.2	CD83.....	98
4.2.1	Expression von rekombinantem CD83.....	98
4.2.2	Biotinylierung von CD83 ^{ext} -Fusionsprotein.....	101
4.2.3	Tetramerisierung von biotinyliertem CD83-Fusionsprotein	102
4.2.4	Durchflusszytometrische Analyse von PBMC nach Färbung mit CD83 ^{tet} :SA-PE	103
4.2.5	Durchflusszytometrische Analysen von Monozyten-abgeleiteten DC mit CD83 ^{tet} :SA-PE	105
4.2.6	Durchflusszytometrische Analyse von CD83L-Expression auf MNC aus Lymphknoten	106
4.2.7	Durchflusszytometrische Analyse von CD83L-Expression auf MNC des Thymus	109
4.2.8	CD83L wird nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin auf der T-Zelllinie CEM exprimiert	116
4.2.9	Einfluss von Tunicamycin auf die CD83L-Expression bei CEM-Zellen	118
4.2.10	Charakterisierung des CD83L durch Glycan Array	121
4.2.11	Ligandencharakterisierung durch Western Blot und ESI-MS	123
5	Diskussion.....	126
5.1	Lektinfärbungen	126
5.1.1	Sialylierung auf Dendritischen Zellen.....	127
5.1.2	Sialylierung auf verschiedenen T-Zellpopulationen und ihre Veränderung bei Aktivierung	128

Inhaltsverzeichnis

5.1.3	Sialylierung von soliden Tumoren	132
5.1.4	Sialylierung auf Leukämie-Zelllinien.....	134
5.1.5	Zusammenfassende Betrachtung und kritische Bewertung der Versuche	135
5.2	CD83	136
6	Zusammenfassung	142
7	Literatur	144
	Veröffentlichungen	159
	Danksagungen	161
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	163
	Tabellarischer Lebenslauf	164

Abkürzungen und Synonyme

AML FAB	Französisch-Amerikanisch-Britische Einteilung der akuten myeloischen Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BCR	B-Zell-Rezeptor
BES	<i>N,N</i> -Bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD83L	CD83-Ligand
CD83 ^{biot}	Biotinyliertes CD83-Fusionsprotein
CD83 ^{ext}	CD83-Fusionsprotein (extrazellulärer CD83-Anteil)
CD83 ^{tet} :SA-PE	Tetramerisiertes CD83-Fusionsprotein
CDG	Congenital disorder of glycosylation
CRD	Carbohydrate recognition domain
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
FACS	Fluorescence activated cell sorting/scanning
FCS	Fötales Kälberserum

Abkürzungen

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related gene
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen- koloniestimulierender-Faktor
HBSS	Hanks' Salzlösung
HCMV	Humaner Cytomegalievirus
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
HSA	Humanes Serumalbumin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAL II	<i>Maackia amurensis</i> Lektin II
Man	Mannose
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MNC	Mononukleäre Zellen
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MWCO	Molecular weight cut-off
NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriessigsäure

Abkürzungen

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nT _{reg}	Natürliche regulatorische T-Zelle
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (Phosphate buffered saline)
PE	(R)-Phycoerythrin
RPMI	Medium welches am „Roswell Park Memorial Institute“ entwickelt wurde
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
sCD83	Lösliches CD83 (soluble CD83)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sia	Sialinsäure
SNL	<i>Sambucus nigra</i> Lektin
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TBS	Tris-gepufferte Saline (Tris buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor β
T _H	T-Helferzelle
T _{reg}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
Well	Vertiefung einer Zellkulturplatte
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Geschichte der Lektine begann Ende des 19. Jahrhunderts mit der Entdeckung, dass Proteine die Fähigkeit besitzen, Erythrozyten zu agglutinieren. Diese Proteine wurden Hämagglutinine oder Phytoagglutinine genannt, da sie ursprünglich in Pflanzenextrakten entdeckt wurden.

Solch ein Hämagglutinin wurde erstmals von Peter Hermann Stillmark in seiner Doktorarbeit, die 1888 an der Universität von Dorpat (heute Tartu, Estland) vorgelegt wurde, beschrieben. Dieses stark toxische Hämagglutinin wurde von Stillmark aus dem Rizinusbaum (*Ricinus communis*) isoliert und Ricin genannt.

1936 konnten Sumner und Howell zum ersten Mal die Zuckerspezifität von Lektinen nachweisen: sie zeigten, dass Concanavalin A sowohl Erythrozyten und Hefezellen agglutinieren, als auch Glykogen aus einer Lösung ausfällen konnte. In weiteren Versuchen wurde demonstriert, dass die Hämagglutination mit Concanavalin A durch Saccharose inhibiert werden konnte (Sharon und Lis, 2004).

Die Fähigkeit von Pflanzenagglutininen, zwischen Erythrozyten der verschiedenen Blutgruppen zu unterscheiden, führte auch dazu, dass Boyd und Shapleigh 1954 für sie den Namen Lektine vorschlugen (lat. legere – auswählen, auslesen) (Boyd, 1954). In den 1960ern gab es zwei wichtige Entdeckungen die Lektine betreffend. Beide Entdeckungen waren auch für die Immunologie von besonderer Bedeutung: Peter C. Nowell zeigte 1960, dass das Lektin aus der roten Kidney Bohne (*Phaseolus vulgaris*), welches Phytohämagglutinin (PHA) genannt wird, die Fähigkeit besitzt, Lymphozyten zur Mitose zu stimulieren (Nowell, 1960). Eine weitere wichtige Entdeckung wurde durch Joseph C. Aub gemacht. Er zeigte, dass Wheat Germ Agglutinin (WGA) die Fähigkeit besaß, bevorzugt maligne Zellen zu agglutinieren (Aub, 1965). Diese und ähnliche Untersuchungen wiesen schon früh darauf hin, dass Veränderungen in der Zelloberflächenglykosylierung mit der malignen Entartung dieser Zellen einhergehen (Sharon und Lis, 2004).

In den folgenden Dekaden spielten Entwicklungen wie z. B. die Affinitätschromatographie, welche einen wichtigen Meilenstein in der Aufreinigung der Lektine darstellte, und die Röntgenkristallographie, die eine dreidimensionale Darstellung von Proteinen erlaubt, eine wichtige Rolle in der weiteren Erforschung der Lektine.

Basierend auf der Analyse der bis dahin bekannten Aminosäuresequenzen tierischer Lektine schlug Kurt Drickamer 1988 vor, dass sich die carbohydratebindende Aktivität der meisten Lektine auf eine bestimmte Polypeptidsequenz beschränkt, die von ihm CRD – Carbohydrate recognition domain genannt wurde (Drickamer, 1988). Basierend auf den Bindungseigenschaften werden die tierischen Lektine heute in strukturell verwandte Familien eingeteilt, von denen die größte die der C-Typ Lektine ist. Andere wichtige Familien sind die P-Typ Lektine und die Siglecs.

Die Funktionen und Aufgaben der Lektine sind vielfältig, eine kleine Auswahl soll in folgender Tabelle exemplarisch dargestellt werden (Sharon und Lis, 2004):

Tabelle 1.1: Beispiele für die vielfältigen Funktionen der Lektine

Lektin	Rolle in
<i>Pflanzen</i>	
verschiedene	Abwehrmechanismen
Leguminosen (z.B. das Lektin Soybean Agglutinin)	Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien
<i>Tiere</i>	
Calnexin, Calreticulin, ERGIC-53	Kontrolle der Glykoproteinsynthese (insbesondere der richtigen Faltung)
Collektine	angeborene Immunität
Galektine	Regulation von Zellwachstum und Apoptose, Regulation des Zellzykluses, Modulation von Zell-Zell-Interaktionen
Mannose-6-Phosphat Rezeptor	Targeting von lysosomalen Enzymen
L-Selektin	„Lymphocyte homing“
E- und P-Selektin	„Leukocyte trafficking“ zu Entzündungsherden

Einleitung

Siglec	Zell-Zell-Interaktionen im Immunsystem und im neuronalen System
Spermadhesin	Oozyt-Spermium-Interaktion

1.1 Lektine

1.1.1 Lektine sind spezifische kohlenhydratbindende Proteine

Als Lektine bezeichnet man Proteine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen binden. Lektine sind ubiquitär, man findet sie bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen. Bei Tieren besteht die wichtigste Funktion der Lektine darin, den Zell-Zell-Kontakt zu beeinflussen. Lektine und Kohlenhydrate sind durch relativ schwache Wechselwirkungen miteinander verbunden; das sichert die Spezifität und erlaubt außerdem bei Bedarf eine Trennung der Bindungspartner. Die Bindungskonstante einer Monosaccharid-Lektin-Interaktion liegt meistens im millimolaren Bereich, deshalb sind oft multiple Bindungsstellen pro Lektin vorhanden (Lis und Sharon, 1998). Die Einteilung der tierischen Lektine basiert auf der Einteilung, die 1988 von Kurt Drickamer vorgeschlagen wurde sowie auf Ligandenbindungseigenschaften und strukturellen Eigenschaften. Bekannt waren damals die C-Typ Lektine, so genannt, da Calciumionen eine wichtige Voraussetzung für die Bindung darstellen und S-Typ Lektine, welche freie Thiolgruppen für die Bindung benötigen (Drickamer, 1988). In der Zwischenzeit sind weitere Gruppen dazu gekommen, so z. B. die P-Typ und I-Typ Lektine. Im Folgenden sollen die einzelnen Gruppen kurz vorgestellt werden und einige wichtige Vertreter genannt werden.

1.1.2 C-Typ Lektine

Die größte Gruppe der Lektine ist die funktionell sehr heterogene Gruppe der C-Typ Lektine. Die Mitglieder dieser Superfamilie können in drei Familien eingeteilt werden – die Selektine, Collektine und Endozytischen Lektine (Sharon und Lis, 2004). Die Selektine sind Typ I Transmembranglykoproteine mit einer N-terminalen C-Typ CRD, welche für die Ligandbindung verantwortlich ist, gefolgt von einer EGF-ähnlichen Domäne und einer variablen Anzahl an zusätzlichen regulatorischen Domänen. Der transmembranspannenden Region schließt sich eine zytoplasmatische Domäne an, welche für Aktivierung und Signaltransduktion wichtig ist. L-Selektin wird vor allem auf naiven Lymphozyten exprimiert, sowohl im Blut als auch in den Lymphorganen.

L-Selektin spielt eine wichtige Rolle im „Lymphocyte rolling“ und in den frühen Schritten der Extravasation.

E-Selektin wird in niedriger Dichte auf Endothel exprimiert, seine Dichte wird jedoch in der Gegenwart von proinflammatorischen Zytokinen stark erhöht. E-Selektin-Liganden werden auf Monozyten, NK-Zellen, Memory T-Zellen, Neutrophilen und Eosinophilen gefunden. E-Selektin spielt eine Schlüsselrolle in der Rekrutierung von Leukozyten zu den Entzündungsherden.

P-Selektine weisen große Ähnlichkeit mit den E-Selektinen auf. Sie werden hauptsächlich auf Thrombozyten, aber auch auf Endothelzellen exprimiert. Auch P-Selektine werden in Gegenwart von inflammatorischen Stimuli heraufreguliert. Sie spielen eine wichtige Rolle im Rolling und in der Leukozytenadhäsion an das Endothel sowie in der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten (Müller et al., 2004).

Alle Selektine binden spezifisch an das Trisaccharid $\text{NeuNAc}\alpha(2-3)\text{Gal}\beta(1-4)[\text{Fuc}\alpha(1-3)]\text{GlcNAc}$, auch Sialyl-Lewis^x genannt oder sein Isomer $\text{NeuNAc}\alpha(2-3)\text{Gal}\beta(1-3)[\text{Fuc}\alpha(1-4)]\text{GlcNAc}$, auch Sialyl-Lewis^a genannt (Stoolman, 1989; Brandley et al., 1990). Die Selektine erkennen die Kohlenhydratliganden jedoch nur, wenn diese an bestimmte Glykoproteine gebunden sind, z. B. an Mucine (Sharon und Lis, 2004).

Collektine sind lösliche Proteine. Der Name Collektin reflektiert ihre Struktur, da sie sowohl eine collagenähnliche Struktur als auch eine C-Typ Lektin CRD haben. Die meisten Collektine sind Oligomere bestehend aus Trimeren an identischen Polypeptidketten (Lis und Sharon, 1998). Die Affinität einer CRD gegenüber eines einzelnen Monosaccharids ist sehr gering, so beträgt die Bindungskonstante des Mannose-bindenden-Lektins gegenüber Mannose ca. 3 mM, die multiplen Bindungen können jedoch die Avidität beträchtlich erhöhen (Iobst et al., 1994). Mikroorganismen, nicht jedoch Zellen von Säugetieren, exprimieren spezifische repetitive Muster an terminalen Zuckern. Deshalb werden Mikroorganismen spezifisch von den CRDs der Collektine erkannt.

Das Mannose-bindende Lektin (MBL) ist der bekannteste Vertreter der Collektine. MBL wird in der Leber synthetisiert und zirkuliert im Blutstrom (Kuhlman et al., 1989). Nach Bindung an Oligomannoside von infektiösen Mikroorganismen bewirkt MBL die Aktivierung von Komplement und darauffolgend die Lyse des Pathogens. Hierzu ist

keine Antikörperbindung notwendig, MBL ist somit ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr (Sharon und Lis, 2004).

Zu den Endozytose-Rezeptoren dieser Familie gehören der hepatische Asialoglykoprotein-Rezeptor, der Makrophagen-Mannose-Rezeptor und das Lektin DEC-205 auf Dendritischen Zellen (Figdor et al., 2002; Müller et al., 2004).

1.1.3 P-Typ Lektine

Es gibt zwei Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, welche die einzigen Mitglieder dieser Familie sind. Sie vermitteln, dass die im rauen ER gebildeten Hydrolasen gezielt zu den Lysosomen der Zelle finden (Hoflack und Kornfeld, 1985). Beide Rezeptoren binden ihre Liganden, Oligosaccharide mit terminalen Mannose-6-Phosphat-Resten, am besten bei pH 6-7. Das erlaubt ihnen, an Hydrolasen, welche diese Liganden tragen, im Golgi-Apparat zu binden und sie in der stärker sauren Umgebung der Lysosomen wieder zu entlassen (Sharon und Lis, 2004).

1.1.4 S-Typ Lektine

Zu den S-Typ Lektinen gehört die immunologisch wichtige Familie der Galektine. Bis heute wurden 14 verschiedene Galektine entdeckt (Acosta-Rodriguez et al., 2004). Galektine sind multivalente Rezeptoren für *N*-Acetyllactosamine mit vielfältigen Aufgaben. Sie agieren als Modulatoren für Zell-Substrat-Interaktionen und sind wichtig für die normale Differenzierung und das Wachstum aller multizellulären Tiere. Sie sind in der Lage Zellproliferation, Zellzyklusarrest oder Apoptose zu induzieren. Sie spielen eine Rolle in der Organmorphogenese, Tumormetastasierung, „Leukocyte trafficking“, Immunantwort und bei Entzündungen sowie bei der Erkennung von extrazellulärer Matrix (Sharon und Lis, 2004).

1.1.5 I-Typ Lektine

Zu dieser Familie gehören die Siglecs (sialic acid binding Ig-like lectins), die ihren Namen durch die Immunglobulin-ähnliche Struktur bekommen haben. In der Zwischenzeit sind 11 Mitglieder dieser Familie bekannt. Die Siglecs sollen hier nur kurz erwähnt werden, da sie in Kapitel 1.1.7 ausführlich behandelt werden.

1.1.6 Weitere Lektine

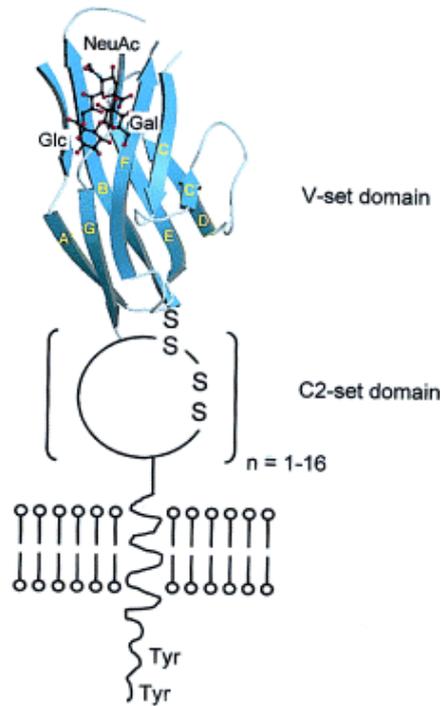
Calretikulin und Calnexin sind Lektine, die intrazellulär eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Glykoproteinen spielen. Calnexin ist ein nichtglykosyliertes Membranprotein, welches intrazellulär am ER lokalisiert ist, wo die Biosynthese der Glykoproteine stattfindet. Es bindet als Chaperon transient an die terminale Glucose von Oligomannoseeinheiten frisch entstehender Glykoproteine und kontrolliert deren Faltung und Oligomierzusammensetzung. Calretikulin ist das lösliche Analogon von Calnexin (Spiro et al., 1996).

1.1.7 Siglecs

Siglecs sind I-Typ (Ig-Typ) Lektine und Typ I Membranproteine. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer Ig-ähnlichen Bindungsdomäne vom V-Typ, welche von einer variablen Anzahl Domänen vom C2-Typ gefolgt wird. Danach schließt sich die transmembranspannende Domäne an. Der intrazelluläre Carboxyterminus enthält meistens inhibitorische Tyrosin-basierte Signaltransduktionsmotive.

Abbildung 1.1: Aufbau der Siglecs

Aus: Crocker und Varki, 2001



Während Siglec-1 (Sialoadhesin) kein inhibitorisches Motiv besitzt, besitzen alle anderen Siglecs ein oder zwei auf Tyrosin basierende inhibitorische Motive (ITIMs) (Crocker und Varki, 2001).

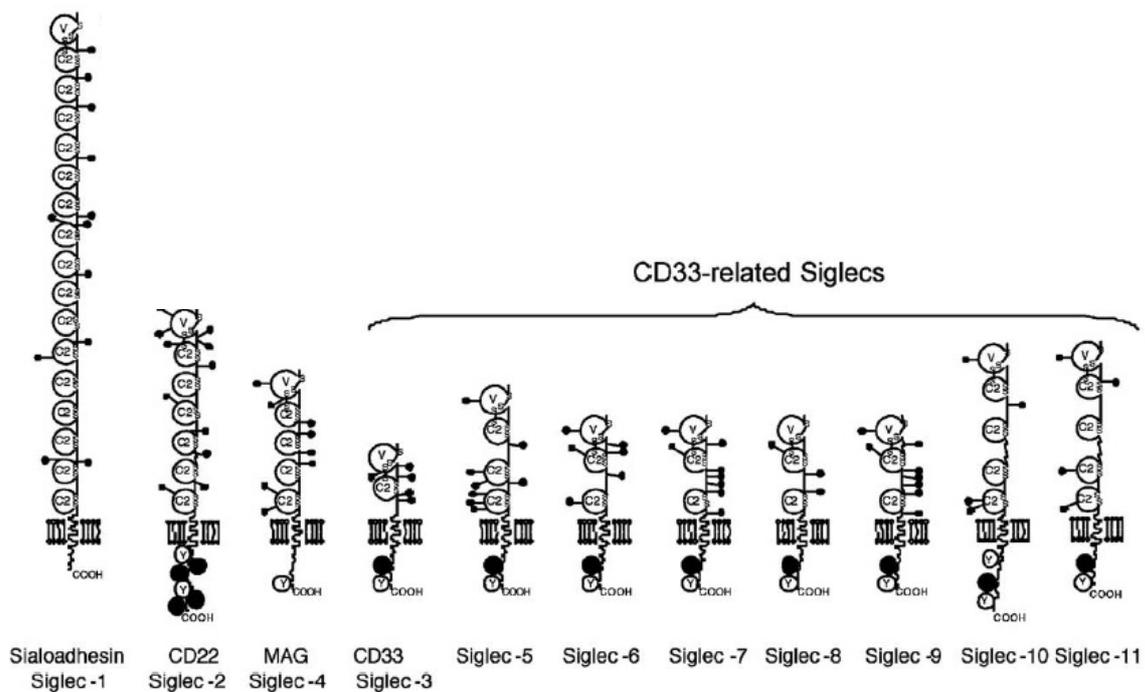


Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau der 11 Siglecs. Adaptiert aus: Lock et al., 2004

Die Regulierung der Immunantwort hängt von der Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen ab. Ihre relative Stärke setzt eine angemessene Aktivierungsschwelle. Inhibitorische Signale werden oft durch Rezeptoren initiiert, die in ihrem zytoplasmatischen Ende ein ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) Motiv aufweisen (Ravetch und Lanier, 2000). Die Konsensus-Sequenz für ITIMs ist (V/I/L)xYxx(L/V), wobei x eine beliebige Aminosäure sein kann. Durch Aktivierung werden die Tyrosine der ITIMs durch Tyrosinkinasen (z. B. aus der Src Familie) phosphoryliert. So entstehen Bindungsstellen, die eine hohe Affinität gegenüber Phosphatasen mit SH2 Domänen aufweisen. Dazu gehören die Proteintyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 und die 5' Inositolphosphatase SHIP (Ravetch und Lanier, 2000). Diese aktivierten Phosphatasen dephosphorylieren Substrate relevanter Signalkaskaden und können somit die Aktivierungsschwelle der Zelle heraufsetzen (Stebbins et al., 2003).

Siglecs binden an Sialinsäure. Sialinsäure ist der generische Name für eine Familie von 9-Carbonsäuren, die Derivate der Neuraminsäure sind.

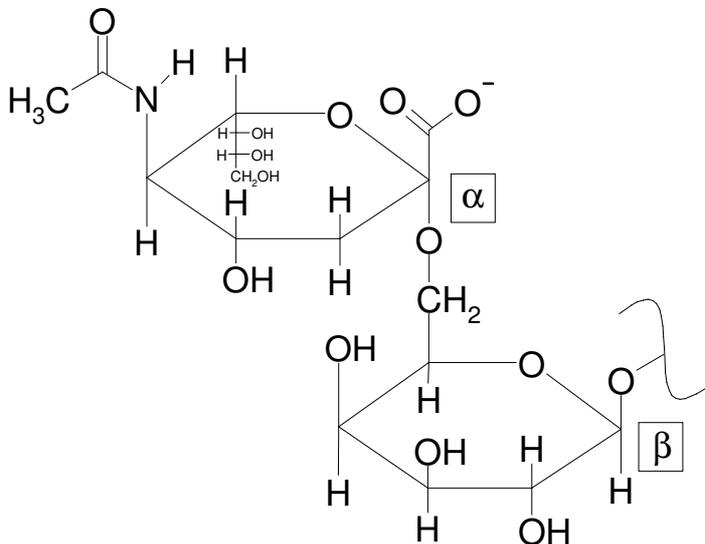


Abbildung 1.3: NeuNA α (2-6)Gal β

Die Sialinsäure ist beim Menschen der häufigste terminale Zucker am nichtreduzierenden Ende von Oligosaccharidketten, die an eine Vielzahl von Proteinen oder Lipiden gebunden sein können. Siglecs erkennen Sialinsäure welche α 2,3-, α 2,6- oder α 2,8-gebunden an Galactose (seltener an *N*-Acetylgalactosamin)

vorliegen (Abbildung 1.3). Die Liganden der einzelnen Siglecs wurden durch eine detaillierte Analyse mit Hilfe von biotinylierten Sialosiden identifiziert, die an Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Konjugate gebunden waren. Es wurden 28 synthetische und strukturell definierte Sialoside getestet, welche die wichtigsten Sialosidsequenzen der Kohlenhydratgruppen von Glykoproteinen und Glykolipiden bei Säugetieren darstellen (Blixt et al., 2003). Manche Siglecs weisen eine hohe Substratspezifität auf, während andere eine geringere Spezifität aufweisen. Auch zeigte sich, dass oft nicht nur die Sialinsäure und deren Bindung eine Rolle spielten, sondern auch die darunterliegende Zuckerstruktur Einfluss auf die Affinität hatte. So binden Siglec-1, -3, -4a und -5 an α 2,3-Sialyllactosamin ($\text{Sia}\alpha(2-3)\text{Gal}\beta(1-4)\text{GlcNAc}$). In Gegenwart von α 1,3-gebundener Fucose wird diese Bindung jedoch stark beeinträchtigt. Das hat eine große Bedeutung bei der Zelladhäsion, da fucosyliertes α 2,3-Sialyllactosamin einen Liganden für Selektine darstellt. So können Siglecs nicht bei der Bindung von Selektin an dessen Liganden stören (Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000).

Bei der Untersuchung zeigte sich, dass auch die Trägerstruktur (z. B. Polyacrylamidbeads) einen Einfluss auf die Bindung haben konnte.

Die Ergebnisse lassen sich vereinfacht wie folgt darstellen (Patel et al., 1999; Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000; Angata et al., 2002; Blixt et al., 2003; Nicoll et al., 2003):

- Siglec-2 bindet spezifisch an α 2,6-gebundene Sialinsäure.
- Siglec-4 (MAG) zeigt eine hohe Spezifität für α 2,3-gebundene Sialinsäure, wobei hier das darunterliegende Glykan einen großen Einfluss auf die Bindung hat. Bemerkenswert war hier auch, dass die Affinität für den Liganden um den Faktor 500-10.000 höher war als die Affinität, die andere Siglecs gegenüber ihren bevorzugten Liganden zeigten.
- Siglec-6 bindet an Sialyl-Tn ($\text{Sia}\alpha(2-6)\text{GalNAc}$), des Weiteren bindet es an Leptin.
- Siglec-1,- 3, -5, -7, -8, -9, -10 erkennen sowohl α 2,3- als auch α 2,6-gebundene Sialinsäure, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Siglec-5 und Siglec-7 binden darüber hinaus an α 2,8-verknüpfte Sialinsäure.
- Siglec-11 bindet bevorzugt α 2,8-verknüpfte Sialinsäure.

Siglecs werden auf nahezu allen Leukozyten exprimiert. Eine Ausnahme stellt Siglec-4 dar, das ausschließlich auf Oligodendrogliazellen und Schwannschen Zellen exprimiert wird (Crocker und Varki, 2001). Siglec-11 ist ein weiteres Siglec, das auch im Nervensystem gefunden wird, nämlich auf den Microgliazellen des Gehirns. Es wird jedoch im Gegensatz zu Siglec-4 nicht ausschließlich im Nervensystem exprimiert. Siglec-11 wurde als letztes Siglec kloniert und charakterisiert (Angata et al., 2002). Aufgrund der Analyse genomischer DNA-Datenbanken kann davon ausgegangen werden, dass Siglec-11 das letzte Mitglied dieser Familie war (Angata et al., 2002).

Jedes Mitglied der Familie hat sein eigenes Expressionsprofil, das im Folgenden kurz dargestellt werden soll.

Tabelle 1.2: Expressionsprofil der 11 humanen Siglecs (Nicoll et al., 1999; Zhang et al., 2000; Crocker und Varki, 2001; Vitale et al., 2001; Angata et al., 2002; Ikehara et al., 2004; Lock et al., 2004; Avril et al., 2005; Varki und Angata, 2005).

Siglec-1 (Sialoadhesin)	Makrophagen
Siglec-2 (CD22)	B-Zellen
Siglec-3 (CD33)	myeloide Vorläuferzellen, Monozyten, Makrophagen
Siglec-4a (MAG)	Oligodendroglia, Schwannsche Zellen
Siglec-5	neutrophile Granulozyten, Monozyten, DC und Gewebemakrophagen, B-Zellen
Siglec-6 (OBBP-1)	B-Zellen, plazentäre Trophoblasten
Siglec-7 (AIRM1)	NK-Zellen, DC, Monozyten, myeloische Zellen, Untergruppen peripherer T-Zellen
Siglec-8	eosinophile Granulozyten
Siglec-9	Monozyten, DC, neutrophile Granulozyten, B-Zellen, NK-Zellen, Untergruppen peripherer T-Zellen
Siglec-10	B-Zellen, eosinophile Granulozyten und Monozyten
Siglec-11	Gewebemakrophagen (z. B. Kupffer Zellen), Mikroglia

In der Literatur wird für Siglec-3, -5, -6, -7, -8, -9, -10 und -11 häufig der Begriff „CD33-verwandte Siglecs“ verwendet. Humane CD33-verwandete Siglecs besitzen

zwischen 2 und 5 Ig-ähnliche Domänen und haben zwischen 50 und 80% Sequenzhomologie. Die Gene, die sie codieren, liegen beim Menschen auf Chromosom 19q13.3-4 und scheinen durch Genduplikationen entstanden zu sein (Crocker und Varki, 2001).

Die meisten Siglecs gehen auf ruhenden Zellen *cis*-Interaktionen ein, das heißt, sie sind an Sialinsäuren auf derselben Zelloberfläche gebunden. Viele Erkenntnisse diesbezüglich konnten anhand von Siglec-2 gewonnen werden. Siglec-2 (CD22) spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der B-Zell-Aktivierung. Es wird von den B-Zellen exprimiert und interagiert mit Sialinsäureresten auf Molekülen derselben Zelle – u. a. auch mit dem B-Zell-Rezeptor (BCR). Diese *cis*-Interaktion führt zu einem inhibitorischen Effekt durch das ITIM-Motiv, so dass die Aktivierungsschwelle höher ist. Während der B-Zell-Aktivierung wird die Sialylierung durch Aktivierung von Neuraminidasen und Herunterregulierung von ST6Gal I reduziert und der BCR aus der Siglec-2-vermittelten Inhibition „befreit“. Dies hat den zusätzlichen Effekt, dass Siglec-2 nun für *trans*-Interaktionen mit sialylierten Molekülen anderer Zellen zur Verfügung steht (Kelm et al., 2002).

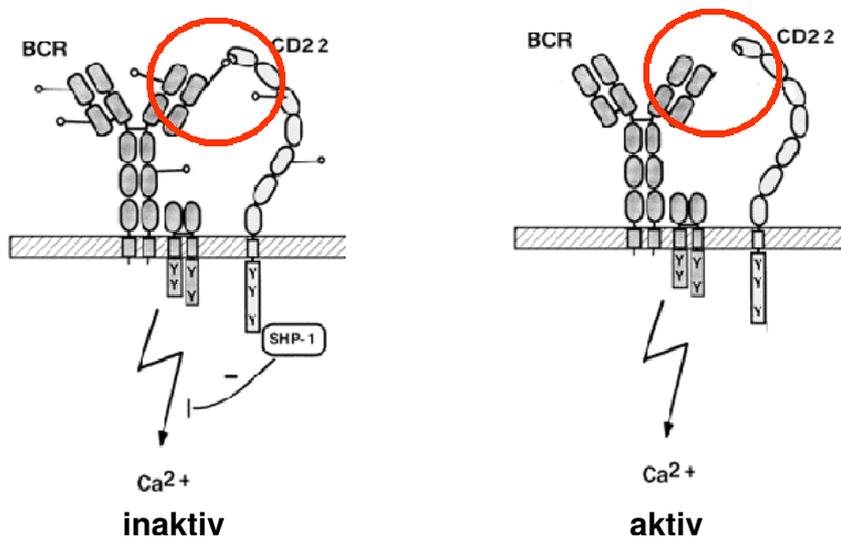


Abbildung 1.4: Interaktion zwischen BCR und Siglec-2 im inaktiven Zustand der Zelle und nach Aktivierung. Während der Aktivierung wird die Sialinsäuredichte reduziert (Sialinsäure symbolisiert durch: ○—). Adaptiert aus: Kelm et al., 2002.

Eine neuere Arbeit konnte jedoch zeigen, dass Siglec-2 auch dann für Liganden auf anderen Zellen für Interaktionen zur Verfügung stehen kann, wenn es in *cis*-Bindung auf B-Zellen vorliegt (Collins et al., 2004). Durch Immunfluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die *cis*-Bindung von Siglec-2 dieses nicht davon abhält, an die Kontaktstelle mit anderen B- oder T-Lymphozyten zu wandern. Es scheint also ein Gleichgewicht zwischen Bindung an *cis*- und *trans*-Liganden zu bestehen.

Kürzlich wurde berichtet, dass die B-Zell-Aktivierung durch Ligation des BCR mit Antigenen, die auf einer Krebszelle exprimiert wurden, vermindert war, wenn gleichzeitig Siglec-2-Liganden auf der Krebszelle koexprimiert wurden (Lanoue et al., 2002). Dies zeigte, dass nicht nur Liganden in *cis*-, sondern vor allem Liganden in *trans*-Bindung Einfluss auf die B-Zell-Aktivierung haben können.

Bakker et al. veröffentlichten interessante Affinitätsstudien bezüglich Siglec-2. Ein bevorzugter Ligand von Siglec-2 stellt CD45 dar, obwohl noch weitere Zelloberflächenproteine *N*-Glykane mit terminaler Sialinsäure in α 2,6-Bindung tragen. Die Affinitätsstudien zeigten, dass Siglec-2 an CD45 bindet, da dieses eine große Anzahl an Liganden für das Siglec-2 trägt. Daraus kann geschlossen werden, dass in diesem Fall das Core-Protein für die Bindung nicht relevant ist (Bakker et al., 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl *cis*- als auch *trans*-Liganden von Siglec-2 Einfluss auf den Aktivierungszustand der B-Zellen haben können. Die Interaktionen mit diesen Liganden sind dynamisch.

Desweiteren ist Siglec-2 für das Homing und die Rezirkulation von B-Zellen von Bedeutung. Es bindet an Liganden die vom Sinusoidalepithelium im Knochenmark exprimiert werden und wirkt somit als Homing-Rezeptor (Nitschke et al., 1999).

In aktuellen Studien konnte auch für weitere Siglecs der inhibitorische Charakter direkt nachgewiesen werden. Für Siglec-7 konnte gezeigt werden, dass es als negativer Regulator der Zytotoxizität von NK-Zellen wirkt (Nicoll et al., 2003). Quervernetzung von Siglec-7 oder Siglec-3 führte zu einer Inhibition der *in vitro* Proliferation von normalen myeloischen Zellen und myeloischen Zellen bei chronisch-myeloischer Leukämie (Vitale et al., 2001). Hierbei ist das ITIM-Motiv für den inhibitorischen Charakter von Siglec-7 und Siglec-9 verantwortlich (Avril et al., 2004). Für Siglec-7 und -9 konnte auch gezeigt werden, dass sie auf T-Zellen als

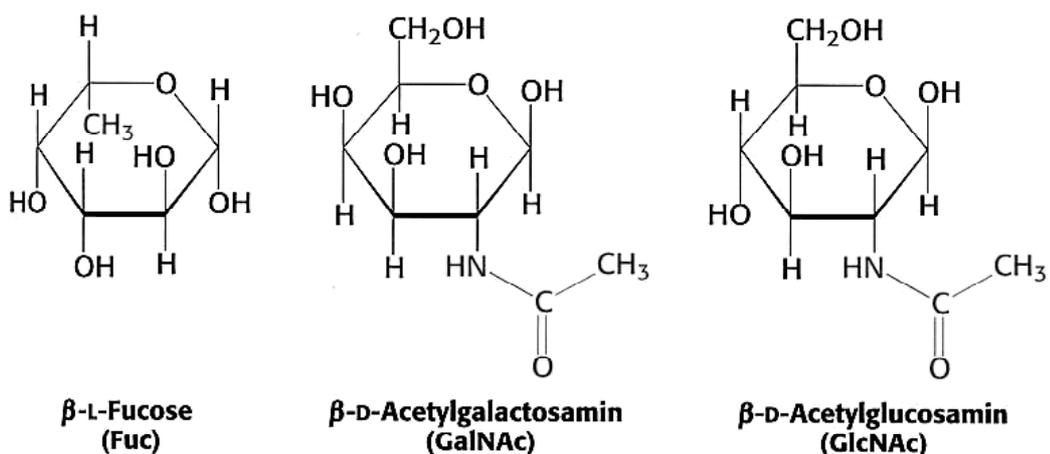
negative Regulatoren bezüglich der T-Zellrezeptor-Signalkaskade wirken und dass hierfür Ligandbindung erforderlich ist (Ikehara et al., 2004). Für Siglec-5 hingegen konnte ganz aktuell nachgewiesen werden, dass es sein inhibitorisches Signal auch ohne ITIM-Phosphorylierung vermitteln kann (Avril et al., 2005).

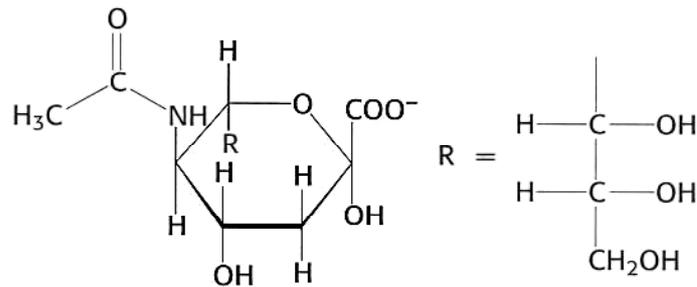
Nach der Einführung in die Lektine und Siglecs sollen im nächsten Kapitel die Liganden näher beleuchtet werden. Dabei soll auf die Entstehung der Glykoproteine und auf die Bedeutung der T-Zell-Glykosylierung, insbesondere im Hinblick auf Entwicklung und Aktivierung, eingegangen werden.

1.2 Kohlenhydrate und Glykosylierung

Die meisten Proteine im Serum und auf der Zelloberfläche liegen als Glykoproteine vor – sie tragen eine oder mehrere Kohlenhydratketten. Für die Vermittlung zellulärer Interaktionen ist die außerordentliche strukturelle Vielfalt innerhalb der Kohlenhydrate eine wichtige Eigenschaft dieser Molekülklasse.

Im Zusammenhang mit den Glykoproteinen spielen die Monosaccharide Glucose, Mannose, Galactose und folgende modifizierten Monosaccharide eine wichtige Rolle:





Sialinsäure (Sia)
(N-Acetylneuraminat)

Abbildung 1.5: Fucose, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin und Sialinsäure spielen im Rahmen von Glykoproteinen eine wichtige Rolle. Aus: Biochemie, 5. Auflage, Jeremy M.Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer.

In Glykoproteinen sind die Kohlenhydrate entweder an das Stickstoffatom der Amidgruppe in der Seitenkette des Asparagins gebunden (N-glykosidische Bindung) oder an das Sauerstoffatom in der Seitenkette von Serin oder Threonin (O-glykosidische Bindung).

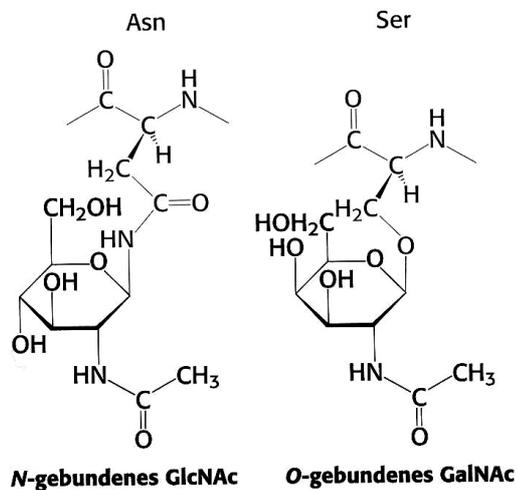


Abbildung 1.6: Beispiele für N- und O-glykosidische Bindungen. Aus: Biochemie, 5. Auflage, Jeremy M.Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer.

Ein Oligosaccharid kann nur an einen Asparaginrest gebunden werden, wenn dieser Teil der Sequenz Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr ist; dabei ist X eine beliebige Aminosäure.

Der *N*-Glykosylierungsprozess verläuft in drei Stufen (Abbildung 1.8). Zuerst übertragen eine Anzahl zytoplasmatischer Enzyme zwei *N*-Acetylglucosamin- und fünf Mannosereste auf das Dolicholphosphat. Dann macht diese große Struktur einen Flip durch die ER-Membran in das ER-Lumen und endoplasmatische Glykosyltransferasen fügen weitere Kohlenhydrateinheiten an. Dieser Prozess endet mit der Bildung eines Oligosaccharids aus 14 Einheiten, das an Dolicholphosphat gebunden ist. Diese Vorstufe wird dann im Ganzen auf einen spezifischen Asparaginrest der wachsenden Polypeptidkette übertragen. Bevor das Glykoprotein das ER verlässt werden drei Glucoseeinheiten von diesem Oligosaccharid aus 14 Einheiten entfernt, und es bewegt sich Richtung Golgi-Apparat

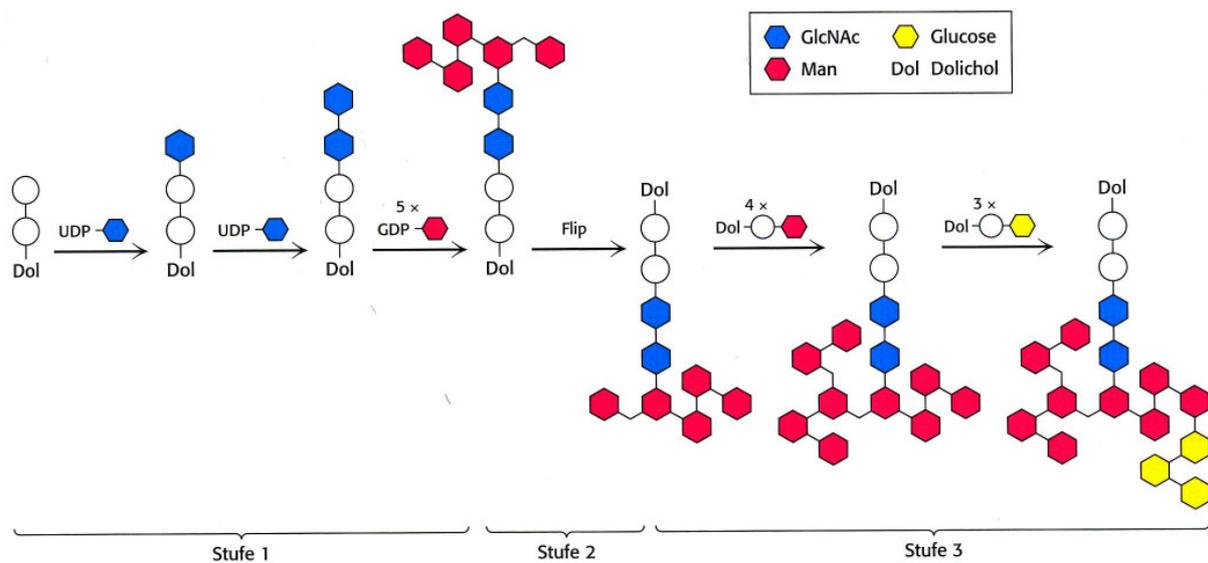


Abbildung 1.8: Der Aufbau einer *N*-gebundenen Oligosaccharidvorstufe an Dolicholphosphat. Aus: Biochemie, 5. Auflage, Jeremy M.Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer.

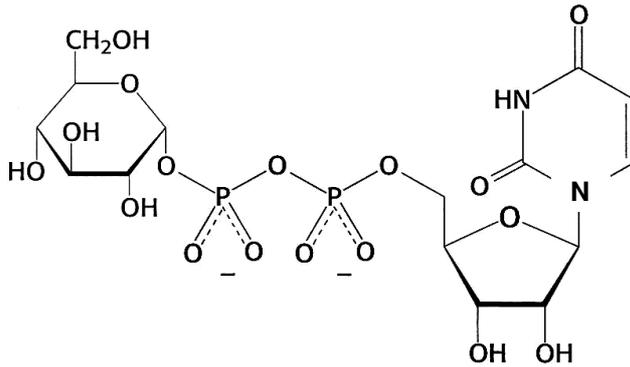


Abbildung 1.9: UDP-Glucose, ein Monosaccharidnucleotid, Beispiel für die aktivierte Form eines Monosaccharids: Aus: Biochemie, 5. Auflage, Jeremy M.Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer.

Diese Abspaltung der Glucosemoleküle ist eine Qualitätskontrolle, die sicherstellt, dass nur richtig gefaltete Glykoproteine weiter prozessiert werden. Nicht vollständig oder falsch gefaltete Glykoproteine erhalten durch eine Glucosyltransferase einen Glucoserest. Diese glucosylierten Glykoproteine binden an Calnexin (oder an das verwandte Protein Calretikulin), das als Chaperon dient und weitere Versuche zur Erlangung der richtigen Faltung erlaubt. Die richtig gefalteten Glykoproteine im Lumen des ER und in der ER-Membran werden also dann zum Golgi-Komplex geführt. *O*-gebundene Zuckereinheiten werden hier neu angefügt. Im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung werden hierbei die aktivierten Zuckereinheiten nacheinander durch verschiedene Glykosyltransferasen direkt auf die wachsende Kette übertragen. *O*-gebundene Oligosaccharide sind generell kurz, meistens bestehen sie nur aus ein bis vier Zuckerresten.

N-gebundene Kohlenhydrateinheiten von Glykoproteinen werden im Golgi-Komplex modifiziert. Dieser Prozess hängt stark vom Entwicklungs- und Aktivierungszustand der jeweiligen Zelle ab und wird streng reguliert. Er kann durch folgende Mechanismen gesteuert werden:

- Regulierung über die Expression der jeweils relevanten Glykosyltransferase-Gene.
- Substratkompetition
- selektive Expression des Akzeptorglykoproteins

Während der „Reifung“ der Glykane wird Mannose abgespalten und Glucose, GlcNAc, Fucose, Galactose und Sialinsäurereste können angehängt werden. Die

Kohlenhydratprozessierung im Golgi-Komplex bezeichnet man als terminale Glykosylierung, im Gegensatz zur Core-Glykosylierung, die im ER stattfindet. Die Glykoproteine können dann mit Hilfe von Sekretgranula sezerniert werden oder in die Plasmamembran eingebaut werden. Selbst auf der Zelloberfläche kann die Struktur des Glykoproteins noch durch Glykosidasen modifiziert werden.

1.2.1 Bedeutung der Glykosylierung in der Entwicklung

Welche wichtige Rolle die Glykosylierung schon in der Entwicklung spielt, zeigen die schweren Störungen, die Patienten mit „Congenital disorders of glycosylation“ (CDGs) aufweisen. CDGs wurden erstmals Anfang der 1980er Jahre beschrieben. Sie sind gekennzeichnet durch Defekte in der Synthese oder der Prozessierung von *N*-gebundenen Oligosacchariden auf Glykoproteinen. Bis heute wurden 10 verschiedene Krankheiten beschrieben. Alle betroffenen Individuen weisen schwere Organstörungen und mentale Störungen auf, viele betroffene Patienten sterben sehr früh an tödlich verlaufenden Infektionen (Grunewald et al., 2002).

Aber nicht nur in der Entwicklung spielt die Glykosylierung eine Rolle, sondern auch Autoimmunerkrankungen wie z. B. die Multiple Sklerose können in Zusammenhang mit einem Glykosylierungsdefekt gebracht werden. Für die T-Zell-Aktivierung wird eine gewisse Mindestanzahl an TCRs an der Stelle der Antigenpräsentation benötigt. Durch CD28 als Corezeptor wird diese Mindestanzahl erniedrigt. Es konnte gezeigt werden, dass durch das Fehlen von β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) die TCR Aggregation verstärkt wird und dadurch die T-Zell-Aktivierung nicht mehr von der Co-Stimulation durch CD28 abhängt (Demetriou et al., 2001). Somit ist die Schwelle für die T-Zell-Aktivierung gesenkt. Mgat5-defiziente Mäuse litten unter Autoimmunnephropathien, verstärkter Hypersensibilität vom Spättyp und einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber experimenteller autoimmuner Encephalomyelitis (EAE).

1.2.2 T-Zell-Glykosylierung

Neben dem Einfluss der Glykosylierung auf die Struktur und das intrazelluläre Trafficking der Glykoproteine spielen Kohlenhydratinteraktionen eine wichtige Rolle in der Lymphozytenentwicklung, der Migration und der Aktivierung durch adäquate Stimuli (Daniels et al., 2002). Kohlenhydrate können Effekte durch ihre physikalischen Eigenschaften wie Ladung oder Größe vermitteln, sie können aber auch spezifische Interaktionen mit endogenen Lektinen wie z. B. den Siglecs oder den Galektinen eingehen.

Reifung und Differenzierung von T-Zellen gehen einher mit Veränderungen in ihrer Oberflächenglykosylierung. Hier spielt vor allem die Sialinsäure eine wichtige Rolle, da sie häufig als terminales Kohlenhydrat an das Glykoprotein gebunden ist. Wichtige Instrumente um die Expression zu untersuchen sind die Bestimmung von Enzymaktivitäten der zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen Glykosyltransferasen (insbesondere der Sialyltransferasen), aber auch Oberflächenfärbungen mit pflanzlichen Lektinen wie PNA, SNL und MAL II, da man durch die Enzymaktivität der Glykosyltransferasen nicht unbedingt auf das Glykoproteinmuster schließen kann. Auch weitere Faktoren wie Glykosidasen und das Vorhandensein von Substraten, bzw. die Konkurrenz um diese können einen großen Einfluss haben.

- PNA bindet an Gal β (1-3)GalNAc, ein O-gebundenes Kohlenhydrat, welches auch als Core-1 O-Glykan bezeichnet wird (Pereira et al., 1976). Dieses Core-1 O-Glykan wird im Zuge der Thymozytenreifung sialyliert, so dass die Bindungsstelle von PNA „maskiert“ wird und PNA nicht mehr binden kann. Durch diesen Verlust der PNA Bindung wurde in einigen Studien indirekt die Sialylierung nachgewiesen. PNA-bindende Glykane wurden auf CD43, CD45 und CD8 Molekülen gefunden (Wu et al., 1996).
- SNL und MAL II weisen direkt eine Sialylierung nach:
 - o SNL bindet an α 2,6-verknüpfte Sialinsäure, bevorzugt an die Struktur Sia α (2-6)Gal/GalNAc, welche häufig an N-gebundenen Kohlenhydratgruppen zu finden ist (Shibuya et al., 1987; Baum et al., 1996).
 - o MAL II bindet an α 2,3-verknüpfte Sialinsäure. Für MAL II wurde eine besondere Affinität gegenüber dem O-gebundenen Tetrasaccharid

Sia α (2-3)Gal β (1-3)[Sia α (2-6)]GalNAc α nachgewiesen. MAL II bindet jedoch nicht ausschließlich an diese Struktur, sondern erkennt auch einige weitere ähnlich Strukturen (Knibbs et al., 1991; Imberty et al., 2000; Martin et al., 2002).

Das folgende Schaubild soll die Veränderungen der Sialylierung von CD8⁺ T-Zellen während der Differenzierung im Thymus und der Aktivierung in der Peripherie vereinfachend zusammenfassen:

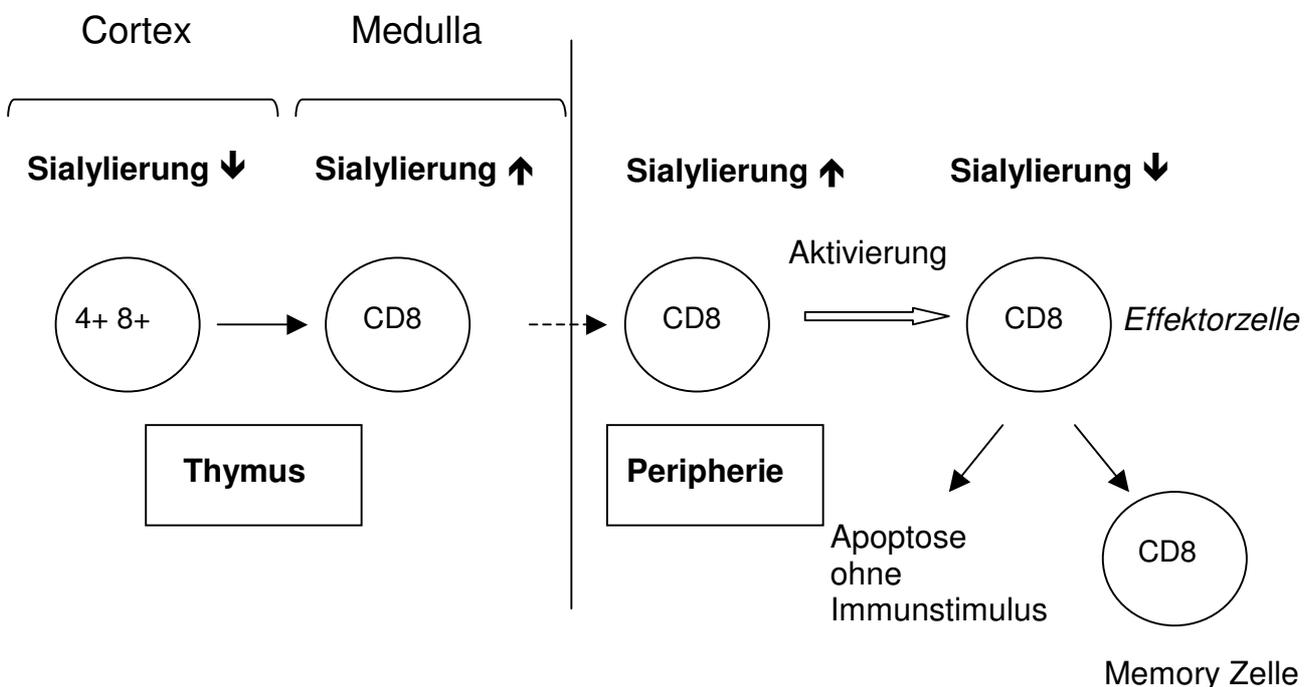


Abbildung 1.10: Veränderungen der Sialylierung von CD8⁺ T-Zellen im Laufe ihrer Entwicklung. Adaptiert aus: Amado et al.; 2004.

Sialylierung der Thymozyten

Die Hauptaufgabe des Thymus ist die Reifung und Selektion von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten aus Vorläuferzellen. Der Thymus ist aufgebaut aus der Subkapsel, dem Cortex und der Medulla. Während der Reifung im Thymus durchlaufen die Thymozyten verschiedene Stadien, beginnend mit einem CD4⁻CD8⁻ Stadium, über das doppelpositive Stadium bis hin zu den einzelpositiven CD4⁺ bzw.

CD8⁺ T-Zellen, die dann in die Peripherie entlassen werden. Jedes Stadium weist ein spezifisches Glykosylierungsmuster auf.

Unreife corticale Thymozyten exprimieren reichlich nichtsialylierte Core-1 O-Glykane (Gal β (1-3)GalNAc α -Ser/Thr) auf ihrer Oberfläche, welche bevorzugte Liganden für PNA sind. Dies führt zu ihrem charakteristischen PNA^{hoch} Phänotyp. Im Kontrast hierzu exprimieren reife medulläre Thymozyten erhöhte Mengen an Sialyltransferase ST3Gal I, welche das Core-1 O-Glykan sialyliert und somit zu einer Struktur führt, die nicht mehr von PNA erkannt wird, nämlich zu Sia α (2-3)Gal β (1-3)GalNAc α -Ser/Thr (Gillespie et al., 1993; Baum et al., 1996; Wu et al., 1996).

Welche Bedeutung diese Veränderung der Sialylierung haben kann, wurde von verschiedenen Gruppen untersucht. Gillespie et al. sehen eine Aufgabe der veränderten Glykosylierung darin, dass die Maskierung des Core-1 O-Glykans durch Sialylierung zu einer Inhibierung der Interaktion zwischen Thymozyten und dem corticalen Epithel führen könnte, so dass die reifen Zellen zur Medulla wandern können (Gillespie et al., 1993). In neueren Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Sialylierung auch Einfluss auf die Selektionierung im Thymus hat: CD8 ist der Corezeptor für T-Zellen, die ihr Antigen im Kontext mit MHC I erkennen. Die spezifischen Glykoformen von CD8 ändern sich während der Entwicklung im Thymus, aber auch noch während der T-Zell-Aktivierung. Daniels et al. wiesen nach, dass der Sialylierungsstatus des Core-1 O-Glykans auf dem CD8 Glykoprotein während der Thymozytenreifung eine wichtige regulierende Rolle spielt (Daniels et al., 2001). CD8, welches auf unreifen doppelpositiven Thymozyten exprimiert wird, ist nur wenig sialyliert (PNA^{hoch}) und bindet effektiv an MHC I. Im Gegensatz hierzu bindet CD8 von reifen Thymozyten, welche stärker sialyliert sind (PNA^{niedrig}) nicht mehr so effektiv an MHC I. Daniels et al. sehen die Bedeutung des Befundes darin, dass durch die CD8-MHC I Interaktion die Adhäsion von unreifen Thymozyten an die Thymusepithelzellen verstärkt wird. Optimale Bindung im doppelpositiven Stadium könnte dazu führen, dass potenzielle selektierende MHC-Liganden, durch Interaktionen mit CD8 an der Kontaktstelle zwischen T-Zelle und Thymusepithel gehalten werden. Dies erleichtert die Examinierung durch den T-Zell-Rezeptor. Dadurch könnte die niedrige TCR-Dichte in diesem Stadium kompensiert werden.

Wie beeinflusst die T-Zell-Sialylierung die CD8-MHC I-Bindung? Darüber kann bisher nur spekuliert werden. Die Sialylierung könnte Einfluss auf die Clusterbildung oder die Konformation der CD8 $\alpha\beta$ -Dimere haben (Daniels et al., 2002). Die Glykosylierung, vor allem die Sialylierung, scheint auch einen Einfluss auf die T-Zell-Sensitivität zu haben. In den Stadien der T-Zell-Differenzierung, in denen die Sialylierung niedrig ist, nämlich bei unreifen Thymozyten und bei aktivierten und/oder Memory T-Zellen, zeigen die T-Zell-Rezeptoren eine erhöhte Sensitivität (Curtsinger et al., 1998; Davey et al., 1998; Daniels et al., 2002). Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür könnte darin liegen, dass die Sialylierung einen Einfluss auf die Fähigkeit des TCR und seinen Corezeptoren hat, sich zusammenzulagern (Daniels et al., 2002). Die funktionelle Bedeutung der Veränderungen in der Glykosylierung, wurde auch durch die Analyse der ST3Gal I-defizienten Maus unterstrichen, welche konstitutiv einen PNA^{hoch} Phänotyp aufweist. Diese Mäuse zeigten keinen Defekt in der Thymozytenentwicklung bzw. ihrer Viabilität. Dafür war aber die Anzahl der naiven CD8⁺ Zellen in der Peripherie aufgrund von erhöhter Apoptose extrem erniedrigt. Die Sialylierung scheint also eine wichtige Rolle in der Kontrolle der CD8⁺ Lymphozyten-Homöostase zu spielen (Priatel et al., 2000).

Sialylierung peripherer T-Zellen

Die Glykosylierung ändert sich erneut, wenn reife T-Zellen aktiviert werden. Ruhende CD8⁺ T-Zellen weisen einen höheren Sialylierungsgrad auf, während sie im aktivierten Zustand dann hyposialyliert sind (Galvan et al., 1998; Pappu und Shrikant, 2004). Eine sehr schöne Studie von Pappu und Shrikant konnte in vivo Daten für die Desialylierung von aktivierten CD8⁺ T-Zellen liefern und somit frühere Berichte bestätigen, welche eine reduzierte Sialylierung auf CD8⁺ Zellen fanden, die auf eine virale Infektion reagierten (Galvan et al., 1998).

Verschiedene Veränderungen innerhalb der Zellen bewirken während der Aktivierung die erniedrigte Sialylierung. Zum Ersten ist die Aktivität der Neuraminidasen nach Aktivierung der T-Zellen erhöht (Landolfi et al., 1985; Taira und Nariuchi, 1988; Galvan et al., 1998). Eine andere Gruppe fand nach Aktivierung eine Erniedrigung der α 2,6-Sialyltransferaseaktivität und parallel dazu eine Stimulierung der β 1,6-GlcNAc-Transferase (Piller et al., 1988). Da beide Enzyme um dieselbe Vorläufersubstanz konkurrieren, führt die koordinierte Veränderung in ihren Aktivitäten zu einer Veränderung der Kohlenhydratstruktur. Die Autoren schlagen für

ruhende T-Zellen folgende Struktur vor: Sia α (2-3)Gal β (1-3)[Sia α (2-6)]GalNAc-Ser/Thr und für aktivierte T-Zellen folgende Verbindung: Sia α (2-3)Gal β (1-3)[Sia α (2-3)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-6)]GalNAc-Ser/Thr. Ein anderer Mechanismus könnte in der de novo-Synthese von Molekülen liegen, deren Core-1 O-Glykane von vorneherein hyposialyliert sind (Amado et al., 2004).

Welche funktionellen Konsequenzen hat die veränderte Sialylierung?

Die Störung des normalen N-Glykosylierungsweges durch Gendefekte kann zu einer zu starken Aktivierung naiver T-Zellen führen und in Autoimmunität resultieren (Demetriou et al., 2001); dagegen führt Überexpression von verzweigten O-Glykanen zu einer verminderten primären T-Zell-Antwort gegenüber Antigenen (Tsuboi und Fukuda, 1997). Da sialylierte Glykane auf peripheren T-Zellen sehr häufig vorkommen, erscheint es möglich, dass ein Teil ihrer Wirkung darauf beruht, dass sie durch ihre Größe und Ladung die Antigenerkennung beeinflussen. Starr et al. konnten nachweisen, dass die Sialylierung zum Teil Einfluss auf die Formierung von „Supramolecular activation cluster“ hat (Starr et al., 2003). Wird die Neuraminidase-Aktivität gesteigert, was folglich zu einer verminderten Sialylierung führt, erreicht man ein verbessertes Ansprechen von T-Zellen auf allogene B-Zell-Stimulation in MLRs (Taira und Nariuchi, 1988). Auch eine weitere Arbeitsgruppe konnte bestätigen, dass eine niedrige Sialinsäuredichte die frühe Aktivierung der T-Zellen verstärkt und die für Proliferation und Differenzierung benötigte Dauer der TCR-Stimulierung verkürzt (Pappu und Shrikant, 2004).

Auch beim Übergang von Effektor CD8⁺ T-Zellen zu Memory Zellen kann wieder eine veränderte Expression der Oberflächen O-Glykane beobachtet werden (Harrington et al., 2000; Priatel et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD8⁺ T-Zellen durch Aktivierung eine Desialylierung erfahren. Diese Desialylierung ist Teil der Regulierung des Aktivierungszustandes von zytotoxischen T-Zellen. Auf die Frage nach dem Mechanismus gibt es einige mögliche Erklärungen, jedoch bleibt die präzise Basis für die regulierende Rolle der Sialylglykane noch uncharakterisiert. In diesem Zusammenhang haben die Siglecs als inhibitorische Rezeptoren für sialylierte

Glykoproteine bisher wenig Beachtung gefunden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Aktivierungszustand von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und den Siglecs wurde im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet.

1.3 Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen (DC) sind die zentrale Schaltstelle im menschlichen Immunsystem. DC sind perfekt ausgestattet für die „immunologische Überwachung“ in der Peripherie unseres Körpers, da sie in der Haut, in den Atemwegen sowie in den interstitiellen Räumen der Organe, den Lymphorganen und im Blut lokalisiert sind. Die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle ermöglicht es ihnen, in praktisch jedes Gewebe des Körpers zu wandern. Hierbei spielen verschiedene Chemokinrezeptoren (CCR) eine wichtige Rolle (Banchereau et al., 2000; Mahnke et al., 2002). Unreife DC sind sehr effizient in der Antigenaufnahme und können hierzu verschiedene Mechanismen benutzen, z. B. die Makropinozytose, die rezeptorvermittelte Endozytose über den C-Typ Lektin-Rezeptor (Mannose-Rezeptor, DEC-205) oder den Fc γ Rezeptor Typ I (CD64) und II (CD32) (Aufnahme von Immunkomplexen und opsonisierten Partikeln) und die Phagozytose zur Aufnahme von apoptotischen und nekrotischen Zellfragmenten, Viren und Bakterien (Banchereau et al., 2000). Fremde und körpereigene Peptide werden auf der Oberfläche mit Hilfe von MHCs präsentiert - auf MHC II oder weniger effizient auf MHC I durch „cross presentation“. Ohne Inflammationsstimulus werden MHC-Moleküle schnell recycled und mit aktuelleren Peptiden auf der Oberfläche präsentiert.

Pathogene und inflammatorische Zytokine führen zu einer Aktivierung bzw. Reifung. Diese „Dendritenreifung“ hängt von dem Zusammenspiel verschiedener Faktoren ab und führt zu funktionellen und phänotypischen Veränderungen. Solche Faktoren können z. B. pathogenassoziierte Moleküle wie LPS, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA sein. Besonders wirkt sich auch das Verhältnis zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Signalen in der Umgebung aus, hierzu gehören TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β und Prostaglandine. Dieser Reifungsprozess führt unter anderem dazu, dass die DC ihre endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren verliert und costimulatorische Moleküle wie z. B. CD80

und CD86 heraufreguliert werden. Die MHC-Dichte auf der Oberfläche wird erhöht und die MHC-Peptid-Cluster werden für mehrere Stunden stabil auf der Oberfläche präsentiert (Banchereau et al., 2000). Außerdem wird in diesem Zusammenhang auch CD83 heraufreguliert, auf das in dieser Arbeit noch genauer eingegangen wird. Darüber hinaus verändert sich das Zytoskelett und es werden andere Chemokinrezeptoren wie z. B. CCR7 auf der Oberfläche präsentiert. CCR7 sorgt dafür, dass die DC von dem Ort der Entzündung zum Lymphknoten wandert (Saeki et al., 1999). Reife DC stellen die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen unseres Immunsystems dar und sind potente T-Zell-Stimulatoren.

Obwohl die Funktion der DC üblicherweise mit der Induktion der primären T-Zell-Antwort in Verbindung gebracht wird, haben DC noch eine weitere wichtige Aufgabe – die Induktion von peripherer Toleranz.

Die zentrale Toleranz wird klassischerweise als die klonale Deletion selbstreaktiver T-Zellen im Thymus beschrieben. Jedoch ist diese zentrale Toleranz nicht vollständig, da nicht alle Selbst-Antigene im Thymus exprimiert werden und einige selbstreaktive Lymphozyten dieser klonalen Deletion entgehen. Außerdem führt die Aussetzung des Körpers gegenüber harmlosen Fremdproteinen in den Atemwegen oder im Darm normalerweise nicht zu einer Entzündung; diese Proteine werden „toleriert“. Es gibt deshalb weitere Mechanismen in der Peripherie, die Toleranz gewährleisten. Hierzu gehören die regulatorischen ($CD4^+CD25^+$) T-Zellen und die toleranzinduzierenden DC. Ohne inflammatorische Signale bleiben antigenpräsentierende DC unaktiviert, wenn sie in die regionalen Lymphknoten wandern. Hier treffen nun naive oder ruhende T-Zellen z. B. auf Selbstantigene, die von diesen unaktivierten DC präsentiert werden. Durch noch nicht genau bekannte Mechanismen führt diese Präsentation von Antigenen durch unaktivierte DC zur peripheren Toleranz u. a. durch Induktion anergischer T-Zellen, T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften und T-Zellen welche immunmodulatorische Zytokine sezernieren (Mahnke et al., 2002). Diese Induktion von Toleranz wurde von Dhodapkar et al. demonstriert (Dhodapkar et al., 2001). Sie zeigten, dass Injektion von antigenbeladenen unreifen DC im Menschen zu einer antigenspezifischen Inhibition existierender Effektor T-Zellen führt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 in T-Zellen mit unreifen DC induzieren lässt.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die funktionellen Eigenschaften der DC sehr stark von ihrem Reifungsstatus abhängen. Unreife DC induzieren Toleranz und reife DC Immunität.

Auch verschiedene DC-Subpopulationen im Respirationstrakt, in den Peyer's Patches und in der Leber können Toleranz induzieren. Diese DC-Subpopulationen führen bevorzugt zu einer T_H2 -Antwort und können eine inflammatorische T_H1 -Antwort unterdrücken (Mahnke et al.; 2002). Im Blut unterscheidet man zwei DC Populationen, DC1 und DC2. Ihre Bezeichnung erhielten sie in Analogie zu den T-Helfer-Zellantworten die sie initiieren. Unterschiede zwischen DC1 und DC2 ergeben sich vor allem in den sezernierten Zytokinen. DC1 sind $CD11c^+ CD123^-$ und weisen einen myeloiden Phänotyp auf. Sie sezernieren u. a. IL-2 und stimulieren eine T_H1 -dominierte Immunantwort. DC2, auch plasmazytoide DC genannt, sind $CD11c^- CD123^+$. Sie sezernieren u. a. IL-10 und stimulieren eine T_H2 -geleitete Antwort. Die vermehrte IL-10-Produktion der T_H2 -Zellen begünstigt die Toleranz, da sie in DC den Toleranz-induzierenden Phänotyp verstärkt (Mahnke et al., 2002; O'Keeffe et al., 2003).

DC sind Gegenstand zahlreicher klinischer Studien, hauptsächlich im Zusammenhang mit der Entwicklung von Tumorstimmungen. Wie man in der obigen Ausführung erkennen kann, ist für eine effektive Immunisierung der Funktionszustand der DC von entscheidender Bedeutung. Andererseits ist es natürlich auch interessant darüber nachzudenken, unreife DC, welche ja eine Antigen-spezifische Inhibition der T-Zellfunktion herbeiführen können, bei Autoimmunerkrankungen oder Organtransplantationen einzusetzen. Hierbei haben unreife DC schon gezeigt, dass sie zu einer verlängerten Allograft-Überlebenszeit in präklinischen Modellen beitragen konnten (Thomson und Lu, 1999).

1.4 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind wichtige Faktoren in der Erhaltung der immunologischen Selbsttoleranz. Für die Erforschung dieser Zellen ist es essenziell Oberflächenmarker zu bestimmen, mit denen man diese Zellen von anderen unterscheiden konnte. CD25 ist ein solcher Oberflächenmarker. 5-10% der $CD4^+$

Zellen und 5% der CD4⁺CD8⁻ reifen Thymozyten tragen ihn auf ihrer Oberfläche. In verschiedenen Zell-Transfer-Experimenten im Mausmodell konnten für CD4⁺CD25⁺ T-Zellen autoimmunpräventive Eigenschaften gezeigt werden (Sakaguchi et al., 1995; Asano et al., 1996). Jedoch wird CD25 von jeder T-Zelle nach Aktivierung exprimiert und kann insofern nicht als alleiniger Marker dienen.

In seiner Eigenschaft als Komponente des IL-2 Rezeptors ist CD25 (IL-2R α) wichtig für die Funktion der regulatorischen T-Zellen (Sakaguchi, 2005). Zwei Forschergruppen zeigten, dass die immunsuppressive Aktivität von T_{reg} in vitro von IL-2 abhängt, durch IL-2 neutralisierende Antikörper konnte diese Wirkung aufgehoben werden (de la Rosa et al., 2004; Thornton et al., 2004). Auch hängt die CD25-Expression auf T_{reg} von IL-2 ab (Curotto de Lafaille et al., 2004). Die Hauptquelle für IL-2 stellen aktivierte T-Zellen dar. IL-2 fungiert in einem Rückkopplungsmechanismus zwischen aktivierten T-Zellen und T_{reg}: Aktivierte T-Zellen sezernieren IL-2, welches für die Funktion und Erhaltung von regulatorischen T-Zellen essenziell ist. Diese wiederum inhibieren die IL-2-Produktion in den Responder-T-Zellen.

Das glukokortikoidinduzierte Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie-verwandte Gen (GITR, TNFRSF18) ist ein weiterer Marker von regulatorischen T-Zellen. Jedoch exprimieren auch andere T-Zellen, B-Zellen, DCs und Makrophagen GITR und erhöhen die Expression nach Aktivierung. GITR trägt zur regulatorischen T-Zell-Funktion bei, da Aktivierung von GITR mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper die CD4⁺CD25⁺ T-Zell-vermittelte Suppression in vivo und in vitro aufheben konnte, was zu Autoimmunität führte (Shimizu et al., 2002).

Weiterhin wird CTLA-4 konstitutiv in T_{reg} exprimiert, während andere T-Zellen dieses Molekül erst nach Aktivierung exprimieren. Auch für CTLA-4 gibt es Studien, die darauf hindeuten, dass CTLA-4 zur immunsuppressiven Aktivität von regulatorischen T-Zellen beiträgt (Read et al., 2000). Hierbei wird ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem Signale via CTLA-4 und dem TCR zusammen T_{reg} aktivieren und zur Suppression führen (Sakaguchi, 2005).

Ein Meilenstein in der Erforschung von regulatorischen T-Zellen stellt Foxp3 (Forkhead transcription factor 3) dar. Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Transkriptionsrepressor dient. Die Identifikation von Mutationen im FoxP3-Gen als Ursache für die tödliche Autoimmunerkrankung IPEX (immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X linked) und dem Mausanalogon, der scurfy

Maus, brachten den Durchbruch auf dem Gebiet (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001)

Patienten mit IPEX präsentieren sich sehr früh mit massiver Lymphoproliferation, insulinabhängigem Diabetes, Thyreoditis, Ekzemen, schwerer Enteropathie und Lebensmittelallergien, welche eine normale Nahrungsmittelaufnahme unmöglich machen. Dazu kommen noch eine autoimmunhämolytische Anämie, Thrombozytopenie und schwere Infektionen. Betroffene männliche Patienten sterben nach 3-4 Wochen.

Foxp3 wird spezifisch in regulatorischen T-Zellen exprimiert. Retroviraler Gentransfer von Foxp3 wandelt naive T-Zellen in Zellen um, die einen Phänotyp haben, ähnlich dem der natürlich auftretenden regulatorischen T-Zellen. So konnte Foxp3 als regulatorisches Schlüsselgen für die Entstehung von regulatorischen T-Zellen identifiziert werden (Hori et al., 2003). Es scheint, als ob Foxp3 die Expression anderer T_{reg} assoziierter Moleküle wie CD25, CTLA-4 und GITR kontrolliert (Sakaguchi, 2005). Während CD25, CTLA-4 und GITR Marker sind, die nicht endgültig in der Lage sind zwischen regulatorischen und aktivierten bzw. Effektor-T-Zellen zu diskriminieren, stellt Foxp3 einen spezifischen Marker für die Population der regulatorischen T-Zellen dar.

Der Mechanismus der Suppression durch T-Zellen konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Es gibt eine Reihe von Faktoren, die dabei eine wichtige Rolle spielen. In frühen Experimenten wurde auch TGF- β und IL-10 eine wichtige Rolle zugesprochen. Dies konnte jedoch durch Experimente in denen TGF- β neutralisiert und IL-10 Rezeptor blockiert wurde widerlegt werden (Jonuleit et al., 2001; Hori et al., 2003).

Fest steht, dass natürliche regulatorische T-Zellen Zell-Zell-Kontakt brauchen, um ihre suppressive Aktivität ausüben zu können (Jonuleit et al., 2002; Hori et al., 2003). Die natürlich auftretenden regulatorischen T-Zellen werden im Thymus als funktionell distinkte und reife T-Zellpopulation gebildet, die durch Foxp3 charakterisiert werden kann (Sakaguchi, 2005). Auch in der Peripherie können T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften entstehen – die induzierten regulatorischen T-Zellen (Ramsdell, 2003). Welche Rolle hierbei z. B. die unreifen Dendritischen Zellen spielen, ist noch ungeklärt. Interessant ist jedoch die Tatsache, dass der natürliche Ligand von GITR auf unreifen DCs, Makrophagen und B-Zellen exprimiert wird und auf reifen DCs herunterreguliert wird (Sakaguchi, 2005).

Jonuleit et al. konnten zeigen, dass CD4⁺CD25⁺ ihre regulatorischen Eigenschaften auf konventionelle T-Helfer Zellen übertragen konnten. Hierzu war Zell-Zell-Kontakt notwendig, lösliches TGF- β spielte eine Rolle. Diese neuen „regulatorischen T-Zellen“ brauchten allerdings zur Ausübung ihrer suppressiven Aktivität keinen Zell-Zell-Kontakt mehr und die Suppressoraktivität wird löslichem TGF- β zugeschrieben (Jonuleit et al., 2002).

Viele Fragen bleiben offen. Fest steht jedoch, dass auf regulatorische T-Zellen interessante Einsatzgebiete in der Medizin warten, z. B. im Bereich der Organtransplantation. Das ultimative Ziel in der Organtransplantation ist die Graft-Toleranz ohne eine ständige generelle Immunsuppression. Hierzu könnte man antigenspezifische regulatorische T-Zellen, die ex vivo mit Hilfe der Antigene von Interesse und hohen Dosen an IL-2 expandiert werden, zur Vermeidung der Transplantatabstoßung einsetzen (Hoffmann et al., 2004; Nishimura et al., 2004).

1.5 Tumoren und Glykosylierung

Toleranzinduktion und T-Zellinhibition sind Mechanismen des so genannten Immune-Escape, auf den maligne Zellen angewiesen sind. Schon sehr früh in der Geschichte der Lektinforschung wurde festgestellt, dass die maligne Entartung von Zellen mit einer veränderten Glykosylierung einhergeht. Dies hat Einfluss auf grundlegende maligne Eigenschaften wie z. B. verstärkte Angiogenese, verminderte Apoptose, Verlust der Kontaktinhibition und das Metastasierungsverhalten. So hat auch die Expression von manchen Glycosylepitopen Einfluss auf die 5- oder 10-Jahres Überlebensrate der Patienten (Hakomori, 2002).

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass die Sialinsäuredichte auf Tumoren oft erhöht ist. (Sata et al., 1991; Dall'Olio et al., 2000; Yamamoto et al., 2001; Tang et al., 2003). Diese Veränderung in der Sialinsäuredichte wurde in den letzten Jahren näher untersucht und es zeigte sich, dass diesem terminalen Kohlenhydrat besondere Bedeutung zukommt. Besonders bei Coloncanceromen führt eine verstärkte Sialylierung Mucin-assoziiertes Kohlenhydrate zu einer verstärkten Metastasierung (Bresalier et al., 1996). Beim humanen Coloncancerom spielt vor allem die Sialinsäure in α 2,6-Bindung eine wichtige Rolle. Während gesundes Colongewebe keine α 2,6-Sialylierung aufweist, konnte diese in hohem Maße auf

Colonicarcinomzellen gefunden werden. Interessanterweise konnte sialyliertes Tn, ein Mucin-assoziiertes Disaccharid, das auch als prognostisch ungünstiger Tumormarker gilt, schon im Golgi-Apparat von Colonadenomen, einer prämaligen Vorstufe des Colonicarcinoms, nachgewiesen werden (Wang et al., 2001).

Veränderungen in der Sialylierung kann man nicht nur bei Adenocarcinomen und Epithelcarcinomen (Chen et al., 2002) beobachten, sondern auch bei Tumoren des ZNS, z. B. Gliomen (Yamamoto et al., 2001). Hierbei zeigt sich jedoch auch, dass nicht nur die α 2,6-Sialylierung bei Tumoren eine Rolle spielt, sondern auch die α 2,3-Sialylierung.

MUC1 (ein epitheliales Mucin-Glykoprotein) ist ein bekanntes Tumorantigen (Bresalier et al., 1996; Mukherjee et al., 2001). Obwohl es bisher viele Versuche gab, Mucin-spezifische CTLs zu generieren, ist der therapeutische Effekt dieses Ansatzes bisher nicht komplett zufriedenstellend (Brossart et al., 2001). Diese T-Zellen infiltrieren zwar den Tumor, greifen ihn aber nicht an (Mukherjee et al., 2001). Neben Mechanismen wie der Sekretion immunsuppressiver Zytokine durch den Tumor, oder die Herunterregulierung von MHC I Molekülen, kann auch spekuliert werden, dass eine veränderte Glykosylierung zum Teil für den Immune-Escape-Mechanismus verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine veränderte Glykosylierung mit dem Grad der Malignität bei Brustkrebs korreliert (Hakim, 1988). Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt, aber es besteht die Möglichkeit, dass inhibitorische Rezeptoren auf der Oberfläche von CTLs und NK-Zellen direkt mit veränderten Glykoproteinen interagieren (Ravetch und Lanier, 2000; Ikehara et al., 2004; Varki und Angata, 2005). Für Siglec-2, -3, -5 und -6 konnte nachgewiesen werden, dass sie an sialyl-Tn binden (Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000). Es könnte also spekuliert werden, dass maligne Zellen die Fähigkeit besitzen, durch differenzielle Glykoproteinexpression inhibitorische Kohlenhydratrezeptoren auf Effektorzellen zu aktivieren, um so eine gegen sie gerichtete Immunantwort abzuschwächen.

1.6 CD83

DC sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Ein wichtiger Marker von reifen DC ist das CD83 (Zhou und Tedder, 1995). CD83 ist ein Glykoprotein mit einer Masse von 45 kDa und gehört zur Ig-Superfamilie. Es besteht aus einer extrazellulären Ig-ähnlichen Domäne vom V-Typ, einer Transmembrandomäne und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne, die nur 39 Aminosäuren lang ist. Diese intrazelluläre Domäne beinhaltet keine bisher bekannten Signalmotive. CD83 wird nicht nur auf reifen DC exprimiert, es konnte auch auf mitogen-aktivierten Lymphozyten gefunden werden (Zhou et al., 1992). Lange Zeit war der Focus auf die Expression von CD83 auf DC gerichtet. Neuere Studien wiesen CD83 auf humanen proliferierenden T-Zell-Blasten nach, außerdem konnte gezeigt werden, dass die CD83-Expression auf Lymphozyten durch NF- κ B während einer adaptiven Immunantwort ausgelöst wird, so dass zunehmend auch die CD83-Expression auf T-Zellen in das Zentrum des Interesses rückt (McKinsey et al., 2000; Munster et al., 2004).

Aktuelle Untersuchungen ergaben, dass präformiertes CD83 schon intrazellulär in Monozyten, Makrophagen und unreifen DC gefunden werden kann, aber erst auf reifen DC stabil auf der Oberfläche exprimiert wird. Die schnelle Expression auf der Oberfläche nach Aktivierung wird posttranslational reguliert in einem Prozess der glykosylierungsabhängig ist (Cao et al., 2005). Eine weitere Gruppe fand CD83 in einem Recycling-Kompartiment von unreifen humanen DC. Durch Inhibierung der Endozytose konnten sie CD83 auf der Oberfläche von unreifen DC exprimieren (Klein et al., 2005).

CD83 liegt jedoch nicht nur in membrangebundener Form vor. Eine lösliche Form von CD83 konnte in humanem Serum von gesunden Spendern nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass dieses lösliche CD83 von aktivierten DC und B-Zellen durch proteolytische Abspaltung des membrangebundenen CD83 freigesetzt wird (Hock et al., 2001). Ganz aktuell wurden jedoch vier verschiedene Splice-Varianten von CD83 nachgewiesen, wobei die längste für das transmembranspannende CD83 kodiert und die kürzeren für das lösliche CD83 (Dudziak et al., 2005).

Die Frage nach dem Liganden von CD83 kann bisher noch nicht eindeutig beantwortet werden. Durch einen Plattenadhäsionsassay wurde gezeigt, dass rekombinantes CD83 (in Form eines CD83-Fc Fusionsproteins) sowohl an reife als auch an unreife Monozyten-abgeleitete DC bindet (Lechmann et al., 2001). Eine andere Gruppe identifizierte CD83 als Adhäsionsrezeptor, welcher an Monozyten und aktivierte oder gestresste CD8⁺ T-Lymphozyten bindet. Die Bindung von CD83 an seinen Liganden scheint abhängig vom Glykosylierungszustand, insbesondere von der Sialylierung zu sein. Der Ligand konnte jedoch bis heute nicht näher identifiziert werden (Scholler et al., 2001). Von der Arbeitsgruppe um Scholler wird CD83 auch als Siglec klassifiziert. In der Maus wird CD83 (mCD83) hauptsächlich auf T-Zellen nach Aktivierung exprimiert. Der Ligand von mCD83 wurde auf B220⁺ Zellen gefunden, konnte aber bisher nicht näher definiert werden (Cramer et al., 2000).

Welche Rolle spielt CD83 im Thymus?

Im murinen Thymus wird CD83 vom Thymusepithel und von DC exprimiert (Fujimoto et al., 2002), während es im humanen Thymus hauptsächlich von DC exprimiert wird (Zhou et al., 1992). Sowohl in einem knock-out Modell als auch in einem Mutagenese-Screening erwies sich CD83 im Mausmodell als essenziell für die Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen im Thymus. CD83-defiziente Mäuse zeigten eine spezifische Blockierung der CD4⁺ Thymozytenentwicklung, ohne dass die Differenzierung der CD8⁺ Thymozyten verstärkt wurde. Dies resultierte in einer Reduktion an peripheren CD4⁺ T-Zellen um 75–90%. Zelltransferexperimente demonstrierten, dass Thymozyten aus CD83-defizienten Mäusen ihr Potential zur normalen Entwicklung behielten, wenn sie in eine Wildtyp-Umgebung transferiert wurden (Fujimoto et al., 2002). Die CD83 knock-out Mäuse zeigten keine offensichtlichen morphologischen Abnormalitäten oder Störungen in der Entwicklung während eines zwölfmonatigen Beobachtungszeitraumes. Sie zeigten allerdings eine verminderte Hypersensibilitätsantwort nach Oxazolone-Behandlung. Der Grund für die beeinträchtigte Hypersensibilitätsantwort könnte darin liegen, dass in CD83-defizienten Mäusen die TCR-Dichte auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erniedrigt ist (Fujimoto et al., 2002). Da in vivo eine reduzierte humorale Immunantwort beobachtet wurde, wird spekuliert, dass CD83 auch für die B-Zellaktivierung von Bedeutung sein könnte (Fujimoto et al., 2002).

Bei Mäusen mit mutiertem CD83-Gen resultierte nicht nur eine Reduktion der CD4⁺ T-Zellzahl, sondern bei diesen Mäusen zeigte sich auch ein verändertes Aktivierungs- und Zytokinprofil dieser Population. CD4⁺ T-Zellen aus diesen Mäusen waren nicht in der Lage normal auf allogene Stimulation zu reagieren, dies ist zumindest teilweise auf das veränderte Zytokinprofil zurückzuführen, welches durch eine verstärkte Produktion von IL-4 und IL-10 und eine verminderte Produktion von IL-2 gekennzeichnet war (Garcia-Martinez et al., 2004). Die Entwicklung und Funktion von CD11c⁺ DC war nicht beeinträchtigt (Garcia-Martinez et al., 2004).

Welche biologischen Funktionen erfüllt CD83 außerhalb des Thymus?

In mehreren funktionellen Studien wurden für lösliches CD83 (sCD83) immunsuppressive Eigenschaften gefunden. Hierbei wurde sowohl eine verminderte T-Zellproliferation als auch eine Abnahme der Zytotoxizität beobachtet (Lechmann et al., 2001; Scholler et al., 2002; Dudziak et al., 2005). Bei unreifen Monozyten-abgeleiteten DC verhinderte lösliches CD83 die vollständige Reifung, auch in Anwesenheit eines Reifungscocktails (Lechmann et al., 2001). In vivo-Daten, welche die immunsuppressive Rolle von sCD83 unterstreichen, wurden in Zusammenhang mit der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) gewonnen. Die EAE der Maus ist ein Modell für die frühen entzündlichen Stufen der humanen Multiplen Sklerose (Bradl und Hohlfeld, 2003). sCD83 konnte die EAE-assoziierte Paralyse sowohl in einem therapeutischen Ansatz, als auch in einem präventiven Ansatz vermindern (Zinser et al., 2004). Histopathologische Untersuchungen ergaben, dass lösliches CD83 die CD45⁺ Leukozyteninfiltration in Gehirn und Rückenmark vermindert.

Die Tatsache, dass sCD83 immunsuppressive Aktivität zeigt, wirft die Frage auf, ob maligne Zellen diesen Mechanismus benutzen, um eine Immunantwort gegen sie zu unterdrücken. Bei der Untersuchung verschiedener hämatologischer Erkrankungen wurden signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von sCD83 nachgewiesen: so zeigten 1/5 der Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und 5/7 der Patienten mit Mantelzell-Leukämie erhöhte Konzentrationen (Hock et al., 2004).

Für sCD83 konnte im in vivo-Modell gezeigt werden, dass es eine anti-Tumor-Immunantwort unterdrücken kann (Scholler et al., 2002). Wurden hingegen Melanomzellen transfiziert, so dass sie CD83 auf ihrer Oberfläche exprimierten,

verstärkte dies die Antitumorimmunität (Scholler et al., 2002). Bevor diese Tumoren eliminiert wurden, wurde eine signifikante Infiltration an CD4⁺, CD8⁺ und NK-Zellen nachgewiesen. Eine erhöhte Anzahl an CD19⁺ Zellen konnte in der Milz nachgewiesen werden (Yang et al., 2004). Auch in vitro wirkte CD83-Ig stimulierend auf die Proliferation von humanen T-Zellen, vor allem auf CD8⁺, wenn es zusammen mit anti-CD3 mAb immobilisiert wurde. Dieser Effekt war jedoch abhängig von der adhärennten Zellfraktion der PBMC (Scholler et al., 2002). Scholler et al. ziehen daraus den Schluss, dass die Interaktion zwischen CD83 und seinen Liganden, welche auf Monozyten exprimiert werden, eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Immunantwort spielen (Scholler et al., 2002).

Über die Funktion von CD83 auf aktivierten T-Zellen ist bisher nicht viel bekannt. In einer Studie mit T-Zellen aus transgenen Mäusen, welche CD83 konstitutiv exprimierten, konnte eine verstärkte Produktion von IFN- γ und Interleukin-2 nach Stimulation mit anti-CD3 nachgewiesen werden (Wolenski et al., 2003). Das fehlende intrazelluläre Signalmotiv von CD83 und die Tatsache, dass es auf aktivierten Lymphozyten exprimiert wird, werfen die Frage auf, ob es eine Rolle in der Migration oder Adhäsion im Zusammenhang mit sekundären Lymphorganen spielt.

Eine Beeinträchtigung der normalen Funktion von DC stellt einen potenten Mechanismus für Viren dar, einer Immunantwort zu entkommen. Für CD83 wurde hier in verschiedenen Studien eine Rolle nachgewiesen (Kruse et al., 2000; Arrode et al., 2002; Senechal et al., 2004). So wurde TGF- β 1, welches in vivo von HCMV-infizierten fibroblastischen Zellen sezerniert wurde, als Faktor identifiziert, der zu einer Herunterregulierung von CD83 auf reifen DC führte (Arrode et al., 2002). Ein weiterer Mechanismus wurde von Senechal et al. beschrieben (Senechal et al., 2004): Während eine Infektion von unreifen DC mit HCMV zur Zellyse führt, ist im Gegensatz dazu die Infektion von reifen DC nicht lytisch (Senechal et al., 2004). Infizierte reife DC verlieren ihr CD83 auf der Oberfläche, während die intrazelluläre Proteinexpression bestehen bleibt. Außerdem akkumuliert sCD83 im Überstand von HCMV-infizierten reifen DC. Das sCD83 könnte aus proteolytischer Abspaltung von membrangebundenem CD83 resultieren, eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre die zelluläre Sekretion. Dieses sCD83 wirkt in MLR inhibierend auf die immunstimulatorische Kapazität von nicht infizierten reifen DC. Eine andere Gruppe

konnte für HSV-1-infizierte reife DC eine verminderte T-Zell-stimulatorische Kapazität nachweisen (Kruse et al., 2000). Sie identifizierten als Mechanismus die spezifische lysosomale Degradation von CD83 durch HSV-1, die zu einer starken Verminderung der CD83-Dichte auf der Zelloberfläche führte.

Bis heute konnte der Ligand von CD83 nicht identifiziert. Auch konnte der genaue Mechanismus über den lösliches CD83 immunsuppressiv und membrangebundenes CD83 immunstimulierend wirkt, noch nicht aufgeklärt werden. Die selektive Expression auf aktivierten DC, welche die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems darstellen, und auf aktivierten T-Lymphozyten deutet auf eine wichtige Funktion hin. Erste Versuche in der Behandlung und Prävention der EAE im Mausmodell deuten auf interessante Einsatzmöglichkeiten im Bereich von Autoimmunerkrankungen hin (Zinser et al., 2004). Bei bestimmten malignen Erkrankungen konnten erhöhte Serumkonzentrationen an sCD83 nachgewiesen werden (Hock et al., 2004). So könnte das immunsuppressiv wirkende sCD83 von malignen Zellen freigesetzt werden, um eine gegen sie gerichtete Immunantwort abzuschwächen.

Um CD83 klinisch nutzen zu können wäre die Identifizierung seines Liganden bzw. seiner Liganden hilfreich. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte eine Bindung von CD83-Fusionsprotein an Monozyten und humane T-Lymphozyten, insbesondere im Zusammenhang mit Apoptose, gezeigt werden (Scholler et al., 2001). Im Western Blot wurde eine Bindung von CD83 an einen 72 kDa großen Liganden nachgewiesen. Dieser Ligand wurde jedoch nicht näher charakterisiert. Eine andere Arbeitsgruppe wies durch Plattenadhäsionsassays eine Bindung von CD83 an reife und unreife DC nach (Lechmann et al., 2001). Jedoch konnte auch diese Arbeitsgruppe bis heute noch keinen Liganden identifizieren.

Die Tatsache, dass CD83 entwicklungsgeschichtlich sehr konserviert zu sein scheint – Homologe wurden erst kürzlich auf immunologisch wichtigen Geweben von Fischen gefunden – weist auf eine wichtige Stellung von CD83 im Immunsystem hin (Ohta et al., 2004).

2 Zielsetzung und Modell

Unreife DC und regulatorische T-Zellen sind als toleranzinduzierende Zellen unentbehrlich, um überschießende Reaktionen des Immunsystems zu verhindern. Der Mechanismus konnte bisher nicht vollständig erklärt werden.

Hypothese: Sialylierungen spielen für die toleranzinduzierende Funktion eine wenig untersuchte Rolle. Die Sialinsäure ist häufig das terminale Kohlenhydrat auf Glykoproteinen der Zelloberfläche. Ihre Expression wird durch zahlreiche Sialyltransferasen und Neuraminidasen streng geregelt. Auf der anderen Seite stehen mit den Siglecs inhibitorische Sialinsäurerezeptoren zur Verfügung, die auf nahezu allen Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Tolerogene Zellen exprimieren sialylierte Liganden und könnten so die inhibitorischen Siglecs auf der Oberfläche von Effektorzellen aktivieren.

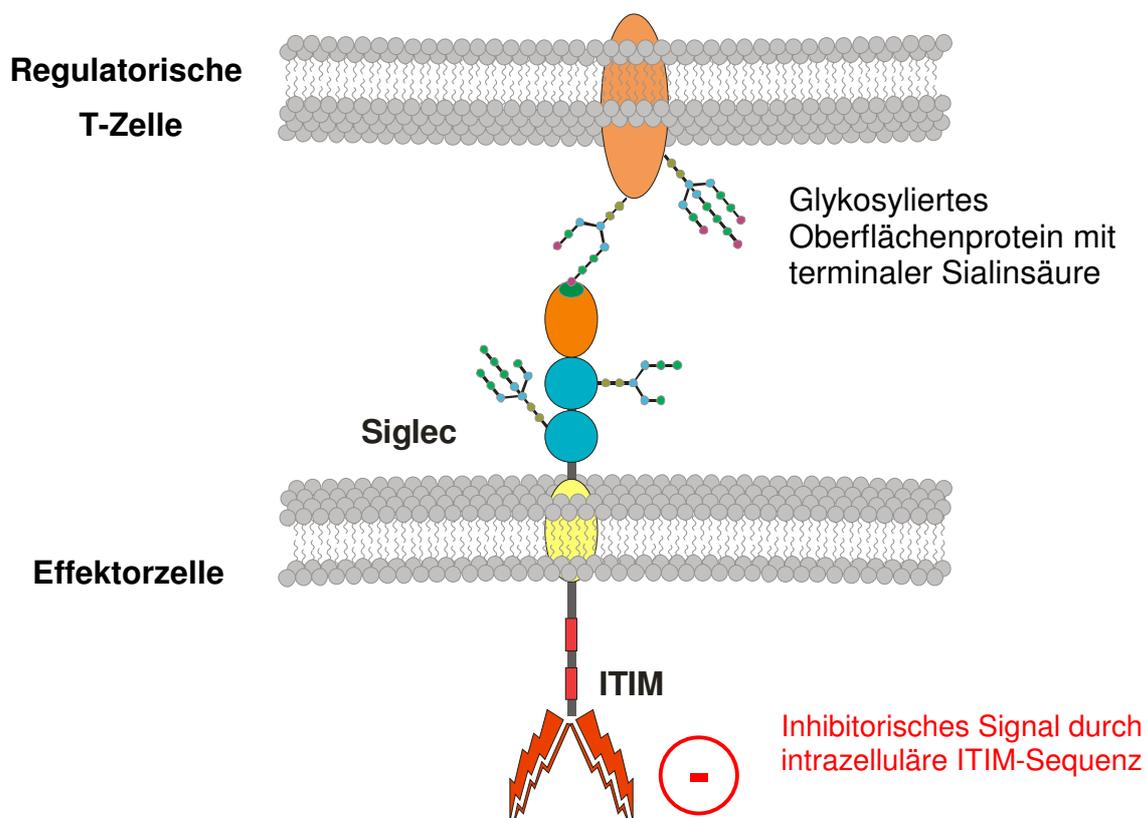


Abbildung 2.1: Modell der Interaktion zwischen Effektorzelle und regulatorischer T-Zelle.

Aufgaben:

1. Durch Detektion mit pflanzlichen Lektinen sollen Unterschiede in der Sialylierung einzelner Subpopulationen nachgewiesen werden.
2. Für funktionelle Assays sollen rekombinante Siglecfusionsproteine exprimiert werden.
3. Ein strukturhomologer Rezeptor, CD83, soll exprimiert werden. Mit Hilfe des rekombinant exprimierten CD83-Fusionsproteins sollen neue Erkenntnisse über den bisher noch unbekanntem Liganden des Rezeptors erhalten werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite	MDS Nordion, Fleurus, Belgien
BioRad Power Pac 200	Bio-RAD, München
Classic E.O.S. Filmentwicklungsmaschine	Agfa, Köln
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Electrophoresis unit mini-Protean II	Bio-RAD, München
Gene Quant II Fotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HERA Cell Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Kryo-Einfriergerät	Qualilab, Bezug über VWR International GmbH, Wien
pH-Meter Multical mit SenTix Plus Messkette	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Schüttler Heidolph Polymax1040	Heidolph, Schwabach
Semi Dry Transfer cell, Trans-Blot	Bio-RAD, München
Horizontale Electrophorese Unit	Sigma-Aldrich, München
Test-Tube-Rotator	Snijders, Tilburg, NL
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tissue Grinder	Wheaton, Millville, NJ
Überkopfmischer Heidolph Reax 2	Heidolph, Schwabach
Ultrazentrifuge Beckmann Avanti J-25	Beckmann, München
Umkehrmikroskop LM Olympus IX50	Olympus, Hamburg
Vario MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
X-cell Surelock II Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, CA
Zellzählgerät COBAS MICROS	Roche Diagnostics, Mannheim

Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
-------------------------	---------------------------------

3.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
6xHis Protein Ladder	Qiagen, Hilden
Ampicillin (Na-Salz)	Roth, Karlsruhe
Annexin-V-Fluos Staining Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-CD14 MACS MicroBeads (keine Angaben zum Klon)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD8 MACS MicroBeads (Klon 135/80)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-PE MACS MicroBeads (keine Angaben zum Klon)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
APS	Sigma-Aldrich, München
BES	Sigma-Aldrich, München
Biocoll Separating Solution Dichte 1,077g/ml (Ficoll)	Biochrom, Berlin
Biotin-Protein Ligase, BIRA500, inkl. Biomix A und B	Avidity, Denver, CO
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA, Fraktion V, mind. 98%, proteasefrei	Sigma-Aldrich, München
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
CAPS	Sigma-Aldrich, München
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg} Isolierungskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Complete Mini EDTA-free, Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim

Material und Methoden

Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich, München
DMEM	Cambrex, Verviers, Belgien
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure p. a.	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Flow®	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
FITC	Pierce, Rockford, IL
Fortecortin 4 mg/ml (INN: Dexamethason)	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
GM-CSF	R&D Systems, Minneapolis, MN
Ham's F-12 Medium	Biochrom, Berlin
Hanks' Salzlösung mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (HBSS)	Biochrom, Berlin oder Cambrex, Verviers, Belgien
Heparin, Canusal	CP Pharmaceuticals LTD, England
HEPES (1 M)	Biochrom, Berlin
Humanes Serum Albumin	Centeon Pharma GmbH, Marburg; jetzt Aventis Behring
IFN-γ	R&D Systems, Minneapolis, MN
IL-1β	R&D Systems, Minneapolis, MN
IL-2	R&D Systems, Minneapolis, MN
IL-4	R&D Systems, Minneapolis, MN
IL-6	R&D Systems, Minneapolis, MN
Imidazol	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LB Medium	LAB M, Lancashire, England
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA

Material und Methoden

Loading Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA
Na-Pyruvat	Biochrom, Berlin
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH (1 M)	Merck, Darmstadt
Na-SDS, Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
OKT3	Orthoclone, Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Opti-MEM I	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien oder Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10 000 IE / 10 000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
PeqGOLD High Range DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Polyglobin	Bayer, Leverkusen
Propidiumiodid	BD Pharmingen, San Jose, CA
Prostaglandin E 2	Sigma-Aldrich, München
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Rainbow coloured molecular weight marker (Rainbow marker)	Amersham, Freiburg
RPMI 1640 (VLE) mit Phenolrot	Biochrom, Berlin
RPMI 1640 (VLE) ohne Phenolrot	Biochrom, Berlin
SA-FITC	BD Pharmingen, San Jose, CA
Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Alexis biochemicals, Grünberg

Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat (SA-HRP)	Amersham, Freiburg
Streptavidin R-Phycoerythrin Konjugat (SA-PE)	Molecular Probes, Eugene, OR
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich, München
Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution	Pierce, Rockford, IL
Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution	Pierce, Rockford, IL
TCA, Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Sigma-Aldrich, München
TNF- α	R&D Systems, Minneapolis, MN
Tris-Base	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% (w/v) in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Tunicamycin	Alexis biochemicals, Grünberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
X-Vivo 20	Bio Whittacker, Verviers, Belgien

3.3 Antikörper und Lektine

anti-CD14-FITC/PE (Klon M ϕ P9)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD19-FITC/PE (Klon HIB19)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD25-APC/PE (Klon M-A251)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD27-PE (Klon L128)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD4-FITC/PE/APC (Klon RPA-T4)	BD Biosciences, San Jose, CA

anti-CD56-FITC (Klon B159)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD62L-PE (Klon DREG-56)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD69-PE (Klon FN50)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD8-APC/FITC/PE (Klon SK1)	BD Biosciences, San Jose, CA
anti-CD83-FITC (Klon HB15A)	Immunotech (Beckman Coulter Inc. company, Fullerton, CA)
anti-CD86-FITC (Klon 2331 (FUN-1))	BD Pharmingen, San Jose, CA
anti-Penta-His-HRP-Konjugat	Qiagen, Hilden
MAL II	Vector Laboratories, Burlingame, CA
MAL II biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Schaf-anti-Maus-Ig-HRP (gekoppelter Antikörper)	Amersham, Freiburg
SNL-FITC	Vector Laboratories, Burlingame, CA

3.4 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Zellkulturplatte, Falcon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ
24-Well-Flachboden-Zellkulturplatten, Costar	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
96-Well-Rundboden-Platten	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Blottingpapiere MN 827B	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Cell Strainer 70 µm Nylon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ
Centricons YM 10	Millipore, Bedford, MA
Einfrierröhrchen (Cryogenic vials) 1,2 ml	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Eppendorfröhrchen Safe-Lock; 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen; 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ

Gele: 4-12% Bis-Tris-Gel und 10% Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Carlsbad, CA
Kanüle 21G (Sterican)	Braun, Melsungen
Kodak X-omat AR Film	Eastman Kodak Company, Rochester, NY
LD+ Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
LS+ Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MS+ Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrocellulosemembran 0,45µM	Invitrogen, Carlsbad, CA
Polypropylen Säulen (5ml)	Pierce, Rockford, IL
Polyvinylidenfluorid-Transfermembran (Hybond-P), PVDF-Membran	Amersham, Freiburg
Rundbodenröhrchen für FACS 5 ml, Polystyrol	BD Bioscience, Discovery Labware, Bedford, MA
Slide-A-Lyzer Dialysier-Kassette, 3500 MWCO	Pierce, Rockford, IL
Spin-X, Zentrifugenfiltrerröhrchen; 0,22 µM	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Zellkulturflaschen; 162 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

3.5 Durchflusszytometrische Analyse der Sialylierung von Dendritischen Zellen

3.5.1 PBMC-Aufreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation

In 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll vorgelegt und mit 30 ml frischem peripherenvenösem Blut (heparinisiert) von gesunden freiwilligen Spendern vorsichtig überschichtet. Danach wurden die Falcon Röhrchen 15 min bei 960g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die Plasmaphasen wurden dann abgenommen und die PBMC aus der Interphase mit 10 ml Pipetten vorsichtig

abgesaugt und in frische 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Diese wurden dann auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 960 g 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Pellets wurden danach vereinigt und nochmals mit 50 ml PBS resuspendiert und 10 min bei 400 g zentrifugiert.

3.5.2 Isolierung von humanen CD14⁺ Zellen

Aus PBMC wurden CD14⁺ Zellen mittels der MACS-Methode isoliert.

„Magnetic activated cell sorting“ erlaubt die Anreicherung oder Depletion bestimmter Zellen im magnetischen Feld mit Hilfe von Antikörpern, die an kleine Eisenoxidpartikel konjugiert sind.

Hierzu wurden PBMC wie unter 3.5.1 beschrieben durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Nach dem Waschen mit PBS wurden die PBMC in MACS-Puffer aufgenommen: PBS + 0,4% HSA

$8 \cdot 10^7$ Zellen wurden in MACS-Puffer mit einer Zelldichte von 10^7 Zellen pro 80 μ l resuspendiert. Pro 10^7 Zellen wurden 16 μ l anti-CD14⁺ MACS MicroBeads-Suspension zugesetzt und 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspension mit ca. 10 ml MACS-Puffer und einer 5-minütigen Zentrifugation bei 400 g und 4°C gewaschen. Die Zellen wurden nun für das MACS-Sortieren in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die MACS-Separation fand mittels eines VarioMACS-Magneten und LS⁺ Säulen statt. Die Säule, eingespannt in den Magneten, wurde hierfür mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert, dann wurden die Zellen appliziert. Die Säule wurde daraufhin mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Die angereicherten CD14⁺ Zellen befanden sich im Eluat, sie wurden 5 min bei 400 g pelletiert und dann in Medium aufgenommen.

3.5.3 Zellkultur und Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten

Es wurden ca. $15 \cdot 10^6$ CD14⁺ Zellen in 25 ml Medium in einer Zellkulturflasche (162 cm²) kultiviert:

Medium:

RPMI 1640 500 ml

100 IE Penicillin/100 µg/ml Streptomycin

2 mM Glutamin

3-5% autologes Plasma (hitzeinaktiviert bei 56°C für 1h. Dieses wurde anschließend bei 3500 g 10 min abzentrifugiert, und nur der Überstand wurde verwendet.)

Zur Generierung von DCs aus Monozyten wurden an den Tagen 0, 2 und 4 jeweils 500 U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF zugegeben.

An Tag 5 wurde die Kultur aufgeteilt. Eine Hälfte der Zellen wurde für 48h mit einem Reifungscocktail für DC bestehend aus 1000 U/ml IL-6, 10 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF- α und 1 µg/ml PGE₂ stimuliert. Die andere Hälfte blieb unstimuliert, so dass man reife und unreife DC miteinander vergleichen konnte.

3.5.4 Durchflusszytometrische Analyse

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse können einzelne Zellen klassifiziert werden. Sie erlaubt Aussagen über die Zellgröße (FSC), die Granuladichte (SSC) und die Intensität der Fluoreszenz der gebundenen fluoreszenz-markierten Antikörper und Lektine.

Die aufgereinigten CD14⁺ Zellen wurden zur Überprüfung der Reinheit am Tag der Aufreinigung mit α CD14 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Am Tag 5 und 7 wurden die DC dann untersucht. Hier wurde zum Einen der Erfolg der Differenzierung der Monozyten zu DC überprüft, zum anderen die Reifung der unreifen DC zu reifen DC.

Mit den pflanzlichen Lektinen SNL-FITC (*Sambucus nigra* Lektin, bindet an α 2,6-sialylierte Glykoproteine auf humanen PBMC) und MAL II-FITC (*Maackia amurensis* Lektin II, bindet vorzugsweise an α 2,3-sialylierte Glykoproteine auf humanen PBMC, Herstellung siehe unten) wurde der Sialyierungsgrad bestimmt. SA-FITC wurde als Negativkontrolle verwendet.

Färbung für die durchflusszytometrische Analyse:

Hierzu wurden in der Regel 500.000 Zellen aus der Zellkultur entnommen und zweimal mit je 2 ml HBSS gewaschen und bei 400 g 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 μ l HBSS aufgenommen. Gefärbt wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit den Antikörpern α CD4, α CD14, α CD83 und α CD86 (jeweils 5 μ l) bzw. den Lektinen MAL II-FITC und SNL-FITC (siehe unten). Im Anschluss wurde wieder zweimal mit je 2 ml HBSS gewaschen und die Proben dann in 200 μ l HBSS aufgenommen. Anschließend wurden die Proben einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die eigentliche FACS-Analyse wurde an einem FACS-Calibur-Gerät durchgeführt. Hierbei wurde die FITC-Fluoreszenz im FL1-Kanal, die Phycoerythrin-Fluoreszenz im FL2-Kanal, die APC-Fluoreszenz im FL4-Kanal gemessen. Nichtlebende Zellen wurden auf der Basis ihrer Eigenschaften im Light-Scatter-Bild elektronisch herausgegated. Die Daten wurden mit Hilfe der CellQuest-Software (Version 3.1) ausgewertet.

Von SNL-FITC (2 mg/ml) wurde für eine Standardfärbung typischerweise 2,5 μ l einer 1: 200 Verdünnung benötigt. Dieser Wert variierte allerdings von Charge zu Charge. Wenn MAL II in der biotinylierten Form erhältlich war, wurde dieses verwendet und zwar für Standardfärbungen typischerweise 1 μ l einer 1:10 Verdünnung. In diesem Fall wurde nach dem ersten Inkubationsschritt einmal mit 2 ml Hanks' Salzlösung gewaschen und anschließend in einem zweiten Schritt mit 1 μ l SA-FITC inkubiert. Falls MAL II nur in der unkonjugierten Form erhältlich war, wurde es nach folgendem Protokoll mit FITC konjugiert:

MAL II-Lyophilisat (1 mg) wurde in 1 ml PBS gelöst und über Nacht in einer Slide-A-Lyzer Dialysier-Kassette, 3500 MWCO gegen 500 ml PBS dialysiert. Am nächsten Tag wurde das gelöste MAL II in ein Eppendorf Cup überführt und es wurden 100 μ l 100 mM Carbonat/Bicarbonat Puffer, pH 9 und eine kleine Spatelspitze FITC zugegeben. Anschließend wurde 2h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Hierbei wurde das Eppendorf Cup mit dem Test-Tube-Rotator rotiert.

Anschließend wurde bei 600 g das überschüssige, ungelöste FITC abzentrifugiert. Um das ungebundene FITC zu entfernen wurde in einer Slide-A-Lyzer Kassette über Nacht bei 4°C unter Lichtausschluss gegen 500 ml PBS dialysiert. Das PBS wurde einmal erneuert. Auch für MAL II wurde die für die Färbung benötigte Menge für jede

Charge festgelegt. Sie betrug für die mit FITC konjugierte Form typischerweise 1 µl pro Röhrchen.

3.6 Durchflusszytometrische Analyse der Sialylierung von humanen T-Zellen

3.6.1 Isolierung der Zellen

Die einzelnen T-Zellsubpopulationen wurden mittels der MACS-Methode isoliert:

Zur Aufreinigung von CD8⁺ T-Zellen wurden 10⁷ PBMC, die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden (siehe 3.5.1), in 90 µl MACS-Puffer aufgenommen. Dann wurden 20 µl αCD8 MicroBeads-Suspension zugesetzt und 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 ml MACS-Puffer resuspendiert und durch 10-minütige Zentrifugation bei 350 g und 4°C pelletiert. Die eigentliche MACS-Separation fand mittels eines VarioMACS-Magneten und MS⁺ Säulen statt. Die Säulen, eingespannt in den Magneten, wurden hierfür mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert und dann die Zellen in 500 µl MACS-Puffer appliziert. Die Säule wurde daraufhin dreimal mit je 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die CD8⁺ Zellen wurden mit 500 µl MACS-Puffer eluiert.

Die isolierten Zellen wurden 10 min bei 350 g abzentrifugiert und dann bis zur durchflusszytometrischen Analyse und das Ansetzen der MLR (beides noch am selben Tag) in RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen.

Alternativ hierzu wurden 5·10⁷ PBMC in 300 µl MACS-Puffer aufgenommen. Dann wurden 15 µl αCD8-PE Antikörper zugesetzt und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 12 ml MACS-Puffer resuspendiert und durch 10-minütige Zentrifugation bei 350 g und 4°C pelletiert. Im nächsten Schritt wurde mit 800 µl MACS-Puffer resuspendiert und es wurden 30 µl anti-PE MicroBeads-Suspension zugesetzt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit 12 ml MACS-Puffer gewaschen, und nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 350 g und 4°C in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die eigentliche MACS-Separation fand bei dieser Variante mittels eines VarioMACS-

Magneten und LS⁺ Säulen statt. Die Säulen, eingespannt in den Magneten, wurden hierfür mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert und dann die Zellen in 5 ml MACS-Puffer appliziert. Die Säule wurde daraufhin zweimal mit je 5 ml MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die CD8⁺ Zellen wurden mit 5 ml MACS-Puffer eluiert.

Der erste Schritt der CD4⁺ Isolation war eine Depletion aller CD4⁻ Zellen. Hierzu wurden in der Regel zu ca. 10⁹ PBMC (siehe 3.5.1) in 900 µl MACS-Puffer, 60 µl eines biotinylierten Antikörpercocktails bestehend aus αCD8, αCD14, αCD16, αCD19, αCD36, αCD56, αCD123, anti-γδTCR und Glycophorin A gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. In einem zweiten Inkubationsschritt wurde 15 min mit 120 µl anti-Biotin MicroBeads auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 12 ml MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 300 g für 10 min bei 4°C gewaschen. Zur Depletion wurde eine LD⁺ Säule in einen VarioMACS-Magneten eingespannt, mit 2 ml MACS-Puffer äquilibriert und dann die Zellen in 500 µl MACS-Puffer appliziert. Der Durchfluss wurde aufgefangen, anschließend wurde noch einmal mit 1,5 ml und zweimal mit 1 ml MACS-Puffer gespült. Auch hierbei wurde der Durchfluss komplett aufgefangen. Der Durchfluss, in dem sich die CD4⁺ Zellen befanden, wurde bei 300 g für 10 min abzentrifugiert. Ca. 5·10⁶ Zellen wurden in RPMI aufgenommen und waren für die spätere durchflusszytometrische Analyse und das Ansetzen der Mixed Lymphocyte Reaction bestimmt. Der Rest wurde in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 60 µl αCD25 MicroBeads 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 12 ml MACS-Puffer wurden die Zellen in 0,5 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine mit 0,5 ml MACS-Puffer äquilibrierte MS⁺ Säule appliziert. Die Säule wurde dreimal mit je 0,5 ml MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und mit 1 ml MACS-Puffer eluiert. Im Eluat befanden sich die CD4⁺CD25⁺ Zellen im Durchlauf die CD4⁺CD25⁻ Zellen.

Da durch diese Separation die CD4⁺CD25⁺ Zellen jedoch nicht vollständig aus dem Durchlauf entfernt wurden, wurde anschließend der Durchlauf nochmals über eine äquilibrierte LD⁺ Säule gegeben.

3.6.2 Mixed Lymphocyte Reaction

Zur Vorbereitung wurde eine 24-Well-Platte mit OKT3 in PBS (50 µg/ml) 4-6 h bei 37°C beschichtet. Anschließend wurden die Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen. Von den CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ Zellen und den PBMCs wurden jeweils 100.000 Zellen/1 ml Medium pro Vertiefung angesetzt. Zusätzlich wurden noch je 20.000 Stimulatoren (allogene PBMC bestrahlt mit 30 Gy, von 2 verschiedenen Spendern) zugesetzt. Alternativ hierzu wurden die CD8⁺ Zellen mit einer Dichte von 10⁶ Zellen/1 ml Medium in einer 6-Lochplatte angesetzt und ohne Stimulatoren inkubiert.

Von den CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden 250.000 Zellen pro Vertiefung angesetzt, da diese Zellen vor allem in der ersten Woche nur sehr langsam wachsen. Zusätzlich wurden auch hier 20.000 Stimulatoren zugesetzt.

Nach ca. 4 Tagen bekamen die Zellen ihren Wachstumsschub, so dass in der Regel alle 2 Tage das Medium erneuert werden musste. Um dies so schonend wie möglich für die Zellen zu machen, wurde jeweils nur die Hälfte des Zellkulturmediums entnommen und durch frisches ersetzt. Alle 5 bis 7 Tage wurden die Zellen zusätzlich restimuliert. Während ansonsten das Medium ohne IL-2-Zusatz zugegeben wurde, wurde zum Restimulieren Medium mit 200 U/ml IL-2 zugegeben, so dass die Gesamtkonzentration wieder 100 U/ml IL-2 im Well betrug.

Medium für CD4⁺CD25⁺ Zellen:

- X-vivo 20
- 20% autologes Plasma (hitzeinaktiviert)
- 100 U/ml IL-2

für alle anderen Zellen wurde in diesem Versuch folgendes Medium verwendet:

- RPMI 1640
- 10% autologes Plasma (hitzeinaktiviert)
- 10 mM Hepes
- 2 mM Glutamin
- 100 IE/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin
- 100 U/ml IL-2

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.6.3 Durchflusszytometrische Analyse

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse wurde der Sialyierungsgrad von PBMC, CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Zellen bestimmt. Hierzu wurden in der Regel jeweils 200.000 Zellen am Tag der Isolierung, nach einer Woche und nach zwei Wochen Stimulierung analysiert. Von den CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden jeweils nur 100.000 Zellen untersucht.

Hierzu wurden die Zellen in eine 96-Well-Platte pipettiert und zweimal mit jeweils 200 µl HBSS gewaschen und bei 350 g für 6 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 100 µl HBSS aufgenommen und mit den Antikörpern bzw. den Lektinen 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit HBSS gewaschen und die mit MAL II-biot inkubierten Zellen wurden in einem zweiten Inkubationsschritt mit 1 µl SA-FITC gefärbt. SA-FITC gefärbte Zellen dienten auch als Negativkontrolle. Nach einer Zentrifugation bei 350 g für 6 min wurden alle Zellen dreimal mit 200 µl HBSS gewaschen, und in 100 µl HBSS resuspendiert.

Die FACS-Analyse wurde an einem FACS-Calibur-Gerät durchgeführt. Hierbei wurde die FITC-Fluoreszenz im FL1-Kanal, die PE-Fluoreszenz im FL2-Kanal, die APC-Fluoreszenz im FL4-Kanal gemessen. Nichtlebende Zellen wurden auf der Basis ihrer Eigenschaften im Light-Scatter-Bild elektronisch herausgated. Die Daten wurden mit Hilfe der CellQuest-Software (Version 3.1) ausgewertet.

Es wurden folgende Antikörper bzw. Lektine verwendet:

CD4-FITC/APC	5 µl/1 µl
CD25- PE/APC	5 µl/1 µl
CD8-FITC/APC	5 µl/1 µl
CD62L-PE	5 µl
CD69-PE	5 µl
CD27-PE	5 µl
SNL-FITC (siehe 3.5.4)	2 µl
MAL II-biot (siehe 3.5.4)	1 µl
SA-FITC	1 µl

3.7 Durchflusszytometrische Analyse von Leukämie-Zelllinien und Tumorzelllinien

3.7.1 Zelllinien und Zellkultur

Es wurden folgende humane Leukämie-Zelllinien untersucht:

K562, eine chronisch myeloische Leukämie (Lozzio und Lozzio, 1975)

KG1a, eine promyeloblastische Leukämie (Koeffler et al., 1980)

HL60, eine akute Promyelozyten-Leukämie (Gallagher et al., 1979)

PLB-985, eine akute myeloische Leukämie (Tucker et al., 1987)

Diese Zelllinien waren ein Geschenk der Arbeitsgruppe Dr. Gunter Kerst (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Tübingen). Sie wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS (hitzeinaktiviert), 2 mM Glutamin und 100 IE/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Es wurden folgende humane Tumorzelllinien untersucht:

RD - eine humane Rhabdomyosarkomzelllinie (McAllister et al., 1969)

Hep G2 - eine hepatozelluläre Karzinomzelllinie (Knowles et al., 1980)

M21 - aus einer Melanom-Metastase (Giuliano, 1978)

A204 - eine Rhabdomyosarkomzelllinie (Giard et al., 1973)

Die Zelllinien wurden von ATCC bezogen, außer Hep G2 diese Zelllinie war ein Geschenk von PD Dr. Martin Schenk (Universitätsklinik für Allgemeine Chirurgie, Tübingen).

Alle Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS (hitzeinaktiviert), 2 mM Glutamin und 100 IE/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wachsen adhärent, so dass die Zellen vor dem Umsetzen trypsinisiert wurden. Hierfür wurde das Medium dekantiert, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml pro Kulturflasche Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% (w/v) in PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺ ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen vom Flaschenboden abgeklopft, abzentrifugiert, in neuem Medium aufgenommen und 1:4 umgesetzt.

Um den Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf die Sialylierung untersuchen zu können wurde jeweils ein Teil der Zellen unbehandelt gelassen, zu einem Teil wurden 200 U/ml IFN- γ und zu einem weiteren Teil der Zellen 200 U/ml IFN- γ und 400 U/ml TNF- α zugegeben. Nach drei Tagen wurde dann die Sialylierung mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht.

3.7.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die Färbung und FACS-Analyse wurde in Anlehnung an das unter 3.5.4 beschriebene Protokoll durchgeführt.

3.8 Expression von Siglec-7- und CD83-Fusionsprotein

3.8.1 Zelllinien und Zellkultur

Zur Proteinexpression wurden folgende adhärenzte, eukaryotische Zelllinien verwendet: CHO-K1 (Puck et al., 1958), COS-7 (Gluzman, 1981) und 293 (Graham et al., 1977). Die Zelllinien CHO-K1 und COS-7 wurden von Dr. Ingo Müller zur Verfügung gestellt, die Zelllinie 293 war ein Geschenk von Dr. Reiner Lammers (Medizinische Universitätsklinik, Tübingen). Die CHO-K1-Zellen wurden in Ham's F-12 Medium + 10% FCS + 2 mM Glutamin + 100 IE Penicillin/100 μ g/ml Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die COS-7-Zellen wurden in DMEM + 10% FCS + 2 mM Glutamin + 1 mM Na Pyruvat + 100 IE Penicillin/100 μ g/ml Streptomycin bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die 293-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Ham's F-12/DMEM (1:1) kultiviert, das mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 100 IE Penicillin/100 μ g/ml Streptomycin supplementiert wurde.

Die CHO-K1-Zellen und COS-7-Zellen wurden, wie zuvor beschrieben (3.7.1), vor dem Umsetzen trypsinisiert. Da die 293-Zellen oft nach dem Trypsinisieren schlecht wieder anwachsen, wurden diese nur durch Klopfen vom Flaschenboden abgelöst und in neuem Medium aufgenommen.

3.8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei 400 g für 10 min abzentrifugiert und dann in 1 ml Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen.

Die Zellen wurden in Kryovials in einem Kryo-Einfriergerät bei -80°C eingefroren und auch dort für 5 d gelagert bis sie in den Stickstofftank überführt wurden.

Sie wurden bei 37°C aufgetaut und sofort in 10 ml Medium, welches in 15 ml Falcon Röhrchen vorgelegt war, überführt. Anschließend wurde bei 400 g für 5 min abzentrifugiert, nochmals mit dem Medium der jeweiligen Zellen gewaschen, dann konnten die Zellen kultiviert werden.

3.8.3 Plasmide

Die Plasmide zur Expression von rekombinanten Siglecs und CD83 wurden von Dr. Ingo Müller konzipiert und hergestellt. Sie wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Zur Veranschaulichung soll im Folgenden kurz auf die Klonierungsstrategie und die Eigenschaften des Plasmids eingegangen werden. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit Siglec-7 und CD83 rekombinant exprimiert wurden, wird sie sich im Weiteren auch nur auf diese beiden beziehen.

Um mit der extrazellulären Domäne von Siglec-7 in weiteren Versuchen arbeiten zu können, werden vom N-Terminus aus gesehen die ersten drei Domänen benötigt. Hierzu gehören die Ig-ähnliche Bindungsdomäne vom V-Typ und zwei C2-Sets. Für die Ligandbindung sind zwar nur die ersten zwei aminoterminalen Domänen notwendig, aber die Anwesenheit einer weiteren Domäne hat für einzelne Siglecs in Versuchen anderer Arbeitsgruppen zu einer höheren Stabilität des Proteins geführt (Kelm, 2001). CD83 ist kürzer, es besteht nur aus einer extrazellulären Domäne.

Von Siglec-7 wurden die drei aminoterminalen Domänen und von CD83 der komplette extrazelluläre Anteil durch RT-PCR aus PBMC hergestellt. Während der RT-PCR wurden gleichzeitig die Restriktionsenzymchnittstellen eingeführt, um das Amplikon in einen Expressionsvektor klonieren zu können.

Da Siglecs selbst glykosyliert werden müssen, um sich korrekt zu falten und ihre Liganden zu erkennen, müssen die Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Deshalb sind die PCR-Produkte nach dem Verdau mit den geeigneten Restriktionsenzymen in den Expressionsvektor pcDNA3.1 V5/His der Firma Invitrogen kloniert worden, der sowohl über einen T7-Promotor zur prokaryotischen Expression als auch über einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression verfügt. Er verfügt außerdem über Resistenzgene für Ampicillin und Neomycin zur Selektion in Bakterien bzw. Eukaryoten. Die Klonierungsstelle von Siglec-7 bzw. CD83 liegt aminoterminal zu dem viralen EpitopV5. Carboxyterminal zu Siglec-7 bzw. CD83 wurde eine Biotinylierungszielsequenz einkloniert, im selben Schritt wurde das virale Epitop V5 herausgeschnitten. An die Biotinylierungszielsequenz schließt sich carboxyterminal das His-Tag an, das aus sechs konstitutiven Histidinen besteht und sowohl zur Aufreinigung als auch zur Detektion verwendet werden kann.

Nachdem die Sequenz der Plasmide verifiziert worden war, wurden sie zur Propagierung in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert.

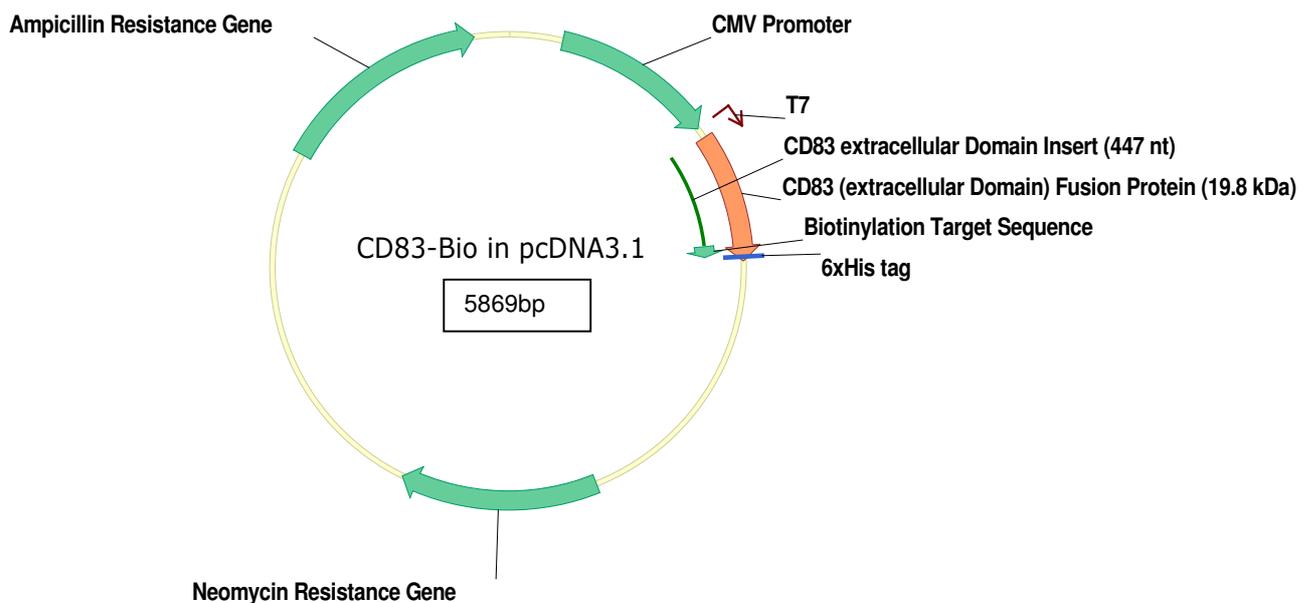


Abbildung 3.1: CD83 in pcDNA3.1

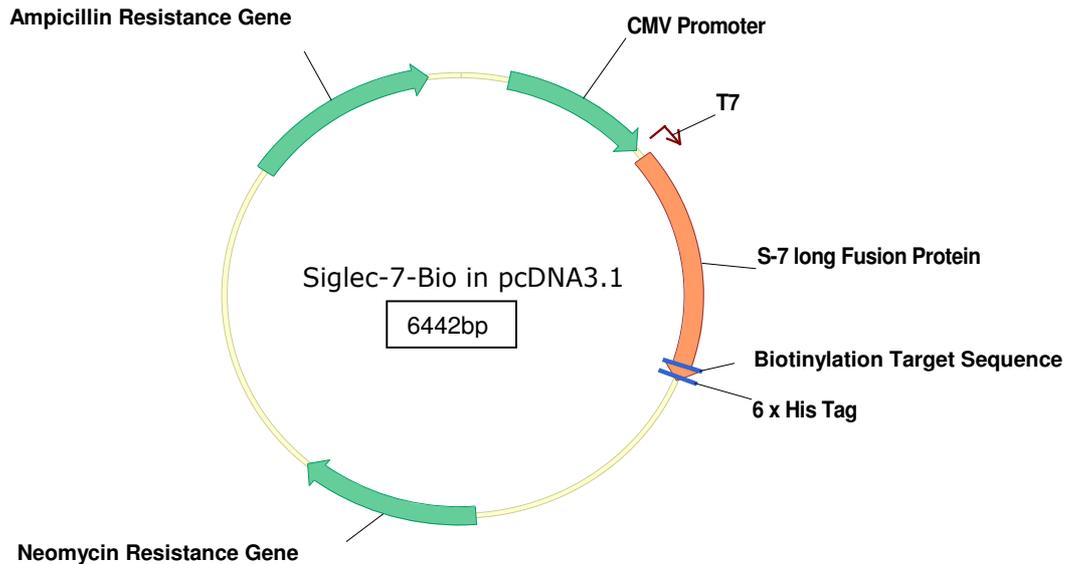


Abbildung 3.2: Siglec-7 in pcDNA3.1

3.8.4 Plasmidisolierung

Die *E. coli*-Bakterien, die das jeweilige Plasmid beinhalten wurden zuerst in einer Vorkultur in 250 ml LB Medium über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 UpM vermehrt. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieser Vorkultur abzentrifugiert, das Pellet resuspendiert und in 250 ml LB Medium zum Subklonieren überführt. In beiden Fällen wurde zur Selektion der Plasmid-enthaltenden Bakterien 100 µg/ml Ampicillin (Na-Salz) zugesetzt. Die Bakterien wurden dann erneut im Schüttelinkubator für ca. 16 h inkubiert. Danach konnten die Bakterien geerntet werden und waren zur Plasmidaufreinigung bereit. Hierfür wurde der Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Nach dem Abzentrifugieren der Kultur für 15 min bei 6000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 16 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Zur alkalischen Lyse wurden 16 ml des Lysepuffers zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 5 min wurde die Lyse beendet, 16 ml des Neutralisationspuffers zugegeben und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Um einen klaren Überstand zu erhalten, wurde dann zweimal für 20-30 min bei 17.700 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils verworfen. Der klare Überstand wurde auf die zuvor mit 10 ml Äquilibrationpuffer vorbereitete Anionenaustauscher-Säule gegeben. Es wurden jeweils 4 Säulen mit einer Kapazität von 100 µg DNA genommen. Um störende RNA und Proteine zu entfernen, wurde

mit je 20 ml Waschpuffer mittleren Salzgehaltes gewaschen. Durch das enthaltene Isopropanol wurden auch Moleküle in unspezifischer hydrophober Bindung von der Säule gewaschen. Mit 5 ml Elutionspuffer mit höherem Salzgehalt wurde dann die DNA eluiert und anschließend mit 7/10 Volumenanteil Isopropanol gefällt. Nach einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 15.500g und 4 °C, wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 8 ml Ethanol 70% (v/v) gewaschen. Dadurch wurden überflüssige Salze entfernt und da das Ethanol leichter flüchtig ist als Isopropanol, konnte das Pellet auch nach einem weiteren Zentrifugationsschritt leicht getrocknet werden. Die aufgereinigte DNA wurde in 1-2 ml dH₂O aufgenommen, die Menge bestimmt und bei 4 °C gelagert.

Zusammensetzung des LB Mediums und der Puffer (Qiagen):

LB Medium pH 7

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
in 800 ml dH₂O

Äquilibrationpuffer

750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Isopropanol (v/v)
0,15% Triton X-100 (v/v)
in dH₂O

Resuspensionspuffer

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A
in dH₂O

Waschpuffer

1,0 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7
15% Isopropanol (v/v)
in dH₂O

Lysepuffe:

200 mM NaOH
1% SDS
in dH₂O

Elutionspuffer

1,25 M NaCl
50 mM Tris-Cl, pH 8,5
15% Isopropanol (v/v)
in dH₂O

Neutralisierungspuffer

3,0 M Kaliumacetat pH5,5
in dH₂O

3.8.5 Agarosegel der Plasmide

Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren ist eine Auftrennung im elektrischen Feld möglich. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel. Im Agarose-Gel wird die DNA aufgrund ihrer Größe aufgetrennt, wobei die Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (1x) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in einen Träger mit Gelkamm gegossen. Für die Beladung wurde die Plasmidlösung mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt, parallel wurde ein DNA-Marker geladen. Die Trennung erfolgte in TAE-Puffer (1x) bei 120 V (Spannung konstant). Gefärbt wurde mit Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) für 15 min. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und emittiert durch Anregung mit UV-Licht bei 590 nm. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografie des Gels unter Anregung durch UV-Licht.

DNA-Ladepuffer (6x)	TAE-Puffer (50x) pH 8,3
Biocoll Lösung	2 M Tris-Acetat
0,25% Bromphenolblau	0,05 M EDTA
	in dH ₂ O

3.8.6 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Eine Aussage über Proteinkontamination in der Lösung ergab sich aus dem Verhältnis von der OD_{260 nm} und der OD_{280 nm}.

Die Konzentration ließ sich aus der gemessenen optischen Dichte durch folgende Formel ermitteln:

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \cdot V \cdot F$$

- c Konzentration der Ausgangslösung
V Verdünnungsfaktor
F Multiplikationsfaktor (50 [$\mu\text{g/ml}$] für dsDNA)

3.8.7 Transfektion mit Lipofectamine

Die zu transfizierenden Zellen (CHO-K1, COS-7 oder 293) wurden am Vortag der Transfektion in ihrem jeweiligen Medium ohne Antibiotika so angesetzt, dass sie am nächsten Tag zu ca. 95% konfluent waren.

Die DNA-Lipofectamine-Komplexe wurden folgendermaßen zubereitet. (Hier dargestellt die für eine Vertiefung einer 6-Lochplatte (ca. 10 cm² Fläche) benötigten Mengen. Für größere Kulturflaschen wurden alle Mengen entsprechend der Fläche angepasst):

5 μg Plasmid-DNA wurden mit 250 μl Opti-MEM I verdünnt. Ebenso wurden 10 μl Lipofectamine mit 240 μl Opti-MEM I verdünnt. Beide Lösungen wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig zusammengemischt und weitere 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 ml Opti-MEM I war die Transfektionslösung fertig.

Die zu transfizierenden Zellen wurden zuerst mit PBS und anschließend mit Opti-MEM I gewaschen, dann wurde die Transfektionslösung vorsichtig in die Schale gegeben.

Nach ca. 5 h Transfektion bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden in dem für sie optimalen Medium weitere zwei Tage inkubiert. Anschließend konnte aus dem Überstand das Protein aufgereinigt werden.

3.8.8 Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation

Diese Transfektionsmethode wurde in Anlehnung an das Protokoll von Chen und Okayama durchgeführt (Chen und Okayama, 1987). Die folgenden Mengen beziehen sich auf die Transfektion von 293-Zellen in einer Vertiefung einer 6-Lochplatte, bei größeren Mengen wurde von allen Substanzen entsprechend der Fläche mehr

genommen, bei anderen Zelllinien (CHO-K1 oder COS-7) wurde das Medium entsprechend angepasst.

Die Zellen wurden so kultiviert, dass sie am Tag der Transfektion zu 60-80% konfluent waren. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt, welches 1/6 Ham's F12 Medium enthielt und 5/6 DMEM. Weiterhin enthielt es 10% FCS und 2 mM Glutamin.

Zur Herstellung des Präzipitats wurde zu 10 µl CaCl₂ 2,5 M (sterilfiltriert) 86 µl dH₂O und 4 µg DNA gegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde diese Lösung tropfenweise zu 100 µl BBS zugegeben, und anschließend kurz durchmischt. Während der 20-minütigen Inkubationszeit wurde die Lösung durch das sich bildende Präzipitat leicht opaque und wurde dann tropfenweise zum Zellmedium zugegeben. Das Medium wurde nach 15-18 h gewechselt in 95% DMEM, 5% Ham's F-12 Medium, supplementiert mit 0,5% FCS und 2 mM Glutamin.

Am nächsten Tag konnte aus dem Überstand das Protein aufgereinigt werden.

BBS:

50 mM BES (*N,N*-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure)

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄

in dH₂O

Die Lösung wurde mit 1 M Salzsäure mit einem pH-Meter der Firma WTW genau auf pH 6,96 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

3.8.9 Isolation des His-Tag-Fusionproteins aus dem Zellkulturüberstand durch Affinitätschromatographie

Zuerst wurde der Zellkulturüberstand (In der Regel 25 ml aus einer 162 cm² Zellkulturflasche; wurde der Überstand mehrerer Zellkulturflaschen aufgereinigt wurden alle Mengen entsprechend des Volumens angepasst.) abgenommen und bei 400 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und dem Überstand 1/5 Volumenanteil Puffer A zugesetzt.

Für die Isolation wurden Polypropylen Säulen (5 ml) mit 500 µl Ni-NTA Agarose beschickt. Anschließend wurde mit 3 ml Puffer A äquilibriert. Der Überstand wurde

auf die Säulen gegeben, im Anschluss wurde zweimal mit je 2 ml Puffer A gewaschen.

Zum Auffangen des Eluats wurde in Eppendorfröhrchen je 20 µl Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) vorgelegt. Es wurden 10 Fraktionen mit jeweils 250 µl Puffer B eluiert. Alle Arbeitsschritte wurden so weit wie möglich auf Eis durchgeführt, um den Proteinabbau zu minimieren. Das so aufgereinigte Protein wird als CD83^{ext} bezeichnet.

Puffer A (pH 8,0)		Puffer B (pH 7,0)	
50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol	250 mM	Imidazol
0,1% Tween 20		0,05% Tween 20	
in dH ₂ O		in dH ₂ O	

3.8.10 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels der SDS-Page lassen sich Proteingemische nach ihrer Molekularmasse auftrennen und anschließend sichtbar machen. Die Proteine wandern hierbei in einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld, die Mobilität der Proteine ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekularmassen.

Probenvorbereitung:

Je 30 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 10 µl Loading Buffer (4x) und 5 µl DTT (0,93 g/ml) versetzt und 5 min bei 98 °C erhitzt.

Gel:

Zur Herstellung des Gels wurde die Gelgießapparatur Mini Protean II von Biorad benutzt. Zuerst wurde das Trenngel bis ca. 2 cm unter den Oberrand der kleineren Glasplatte in die Apparatur gefüllt. Das Gel wurde vorsichtig mit Isopropanol bedeckt.

Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Isopropanol abgegossen und mit Wasser gespült. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und anschließend der Kamm eingesteckt. Nach weiteren 30 min Polymerisationszeit war das Gel einsatzbereit.

30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)

Trenngel-Puffer (4x)

91 g Tris-Base

in 300 ml dH₂O lösen und pH mit 1M HCl auf 8,8 einstellen

auf 500 ml mit dH₂O auffüllen

2 g SDS

Lagerung bei 4 °C für 2 Monate

Sammelgel-Puffer (4x)

6,05 g Tris-Base

in 40 ml dH₂O lösen und pH mit 1 M HCl auf 6,8 einstellen

auf 100 ml mit dH₂O auffüllen

0,4 g SDS

Lagerung bei 4 °C für 2 Monate

Laufpuffer (10x)

30,3 g Tris-Base

144 g Glycin

10 g SDS

auf 1000 ml dH₂O auffüllen

Lagerung bei 4 °C für 2 Monate

Trenngel 10%:

30% Acrylamidlösung 5 ml

Trenngel-Puffer (4x) 3,75 ml

dH₂O 6,25 ml

TEMED 0,01 ml

10% APS 0,5 ml

Sammelgel:

30% Acrylamidlösung	0,65 ml
Sammelgel-Puffer (4x)	1,25 ml
dH ₂ O	3,05 ml
TEMED	5 µl
10% APS	0,04 ml

Alternativ wurde ein 10% oder 4-12% Bis-Tris-Gel verwendet. Als Laufpuffer wurde in diesem Fall MOPS SDS Running Buffer genommen.

Elektrophoreseapparaturen:

Bei einem selbst gegossenen Gel wurde eine BioRad Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN II Cell) verwendet, bei einem Bis-Tris-Gel wurde die X-cell Surelock Kammer von Invitrogen genommen. Die Stromquelle war in beiden Fällen BioRad Power Pac 200.

Laden des Gels und Elektrophoresebedingungen:

In der Regel wurden 20 µl der vorbereiteten Proben vorsichtig in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Als Marker wurden Rainbow coloured molecular weight marker und 6xHis Protein Ladder aufgetragen.

Bei 150 V (V=konstant) wurde 60 min elektrophoriert.

3.8.11 Schnelle Proteinfärbung nach Coomassie

Zuerst wurde das Gel für 30 min in Fixierlösung inkubiert. Zur Färbung wurde das Gel für 2h bei Raumtemperatur in Färbelösung gelegt und anschließend bis zum gewünschten Kontrast in Entfärbelösung entfärbt. Hierbei wurde nach ca. 1h die Entfärbelösung erneuert.

Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert. Mit Hilfe der Coomassie-Methode war es auch möglich die Proteinkonzentration ungefähr abzuschätzen. Hierzu wurde zum Vergleich bovines Albumin in verschiedenen Konzentrationen, im erwarteten Bereich,

aufgetragen. Durch Vergleich der Banden wurde die Konzentration optisch abgeschätzt.

Fixierlösung:

25% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Essigsäure
in dH₂O

Färbelösung:

10% Essigsäure
0,006% Coomassie Brilliant Blue G250
in dH₂O

Entfärbelösung:

10% Essigsäure
in dH₂O

3.8.12 Western Blot

Da die Proteinnachweisgrenze bei der Coomassiefärbung bei ca. 1 µg pro Bande liegt, wurde häufig ein Western Blot gemacht und das Fusionsprotein mit Antikörpern gegen das His-Tag detektiert. Dies hatte den Vorteil, dass wesentlich kleinere Proteinmengen nachgewiesen, und die komplette Translation sichergestellt werden konnten. Hierzu wurde die PVDF-Transfermembran für 15 sec in Methanol aktiviert. Im nächsten Schritt wurden Gel, Transfermembran und die Blottingpapiere in Transferpuffer 5 min äquilibriert. Geblottet wurde in einer Semi Dry Transfer cell. Für eine Membran von 60 cm² wurde für eine Stunde eine Stromstärke von 0,06 A (I = konstant) benötigt. Die Membran wurde im Anschluss für 15 sec in Methanol fixiert und dann 5 min in TBS äquilibriert. Es stellte sich heraus, dass das Blockieren in 2% boviner Albuminlösung (in TBS) die besten Ergebnisse lieferte. Nach dem Blockieren wurde zweimal 5 min in TBST gewaschen und dann in der Regel über Nacht mit Antikörperlösung bei 4 °C inkubiert. Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Antikörper eingesetzt:

- anti-Penta-His-HRP-Konjugat (1:2500 in TBST) wurde eingesetzt, um das His-Tag der Fusionsproteine zu detektieren,
- mit Streptavidin-HRP-Konjugat (1:2500) in TBST konnte die Biotinylierung nachgewiesen werden,

- anti-CD83-FITC (1:1000 in TBST) wurde zum spezifischen Nachweis von CD83 eingesetzt. Hier wurde in einem zweiten Schritt 4h mit anti-Mouse-Ig-HRP-Antikörper (1:5000) in TBST inkubiert.

Nach der Inkubation mit Konjugat- bzw. Antikörperlösung wurde dreimal 10 min mit TBST gewaschen und die Membran dann mit ca. 6 ml einer 1:1 Mischung von Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution und Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution beträufelt. Nach 5 min Reaktionszeit wurde die Membran in Folie eingeschweißt und damit ein X-omat AR Film 5-15 min belichtet. Dieser Film wurde automatisch in der Classic E.O.S. Filmentwicklungsmaschine entwickelt.

Tris buffered saline (TBS) pH 7,6

12,1 g Tris-Base

40 g NaCl

dH₂O ad 5000 ml

pH wurde mit HCl (1 M) eingestellt

TBS-Tween

TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20

CAPS-Transferpuffer (pH 11)

10 mM CAPS, 3-(Cyclohexylamin)-propan-1-sulfonsäure

0,005% SDS

1% Methanol

in dH₂O

pH wurde mit NaOH (1 M) eingestellt

3.8.13 Weitere Aufarbeitung von CD83^{ext} und Biotinylierung

In den bei Schritt 3.8.9 erhaltenen Fraktionen 2-7 konnte im Western Blot die Hauptmenge des Proteins nachgewiesen werden. Diese Fraktionen wurden gepoolt und in Zentrifugenterrörchen (Centricons YM 10, 10.000 MWCO) auf 1/10 ihres Volumens eingengt und anschließend umgepuffert. Hierzu wurde dreimal mit Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) bis zum Startvolumen aufgefüllt und anschließend wieder auf 1/10 eingengt. Zentrifugiert wurde bei 3500g und 4°C. Die Zentrifugationszeit war variabel, dauerte aber meistens pro Schritt 80 min. Beim letzten Schritt wurde zentrifugiert bis ca. 200 µl Endvolumen erreicht waren.

Die CD83^{ext} Konzentration betrug zwischen 10 und 30 µg/ml.

Pro Zellkulturflasche mit 162 cm² ergaben sich im Schnitt 2-3 µg CD83^{ext}.

Biotinyliert wurde mit Hilfe der Biotin-Protein-Ligase BIRA500 (Avidity, Denver, CO). Dazu wurden zur Substratlösung 10% Biomix-A, 10% Biomix-B und je nach Proteinmenge 2-4 µl BIRA500 Enzym gegeben. Die Reaktionszeit betrug 1 h bei 30°C. Hierbei wurde auf dem Thermomixer leicht geschüttelt.

Biomix-A		Biomix-B	
0,5 M	Bicine Puffer (pH 8,3)	100 mM	ATP
in dH ₂ O		100 mM	MgOAc (Magnesiumacetat)
		500 µM	Biotin
		in dH ₂ O	

Nach der Reaktion wurde über Nacht dialysiert. Hierzu wurde das biotinylierte CD83 mit 21 G-Nadeln vorsichtig in eine Slide-A-Lyzer Dialysier-Kassette, 3500 MWCO eingespritzt. Dialysiert wurde über Nacht gegen 500 ml PBS bei 4°C, 2 h vor Ende wurde das PBS erneuert. Das biotinylierte CD83-Fusionsprotein wird im Folgenden als CD83^{biot} bezeichnet.

3.8.14 Tetramerisierung mit Streptavidin-PE

Um das CD83-Fusionsprotein tetramerisieren zu können, musste die Konzentration von CD83^{ext} bekannt sein. Diese wurde nach Färbung des Gels nach der Coomassie-Methode visuell gegen Albuminstandards abgeschätzt (Abschnitt 3.8.11). Um Tetramere zu erhalten, wurde Streptavidin-(R)-Phycoerythrin-Konjugat (SA-PE) zu CD83^{biot} im molaren Verhältnis 1:4 dazugegeben. Die optimal SA-PE Menge wurde folgendermaßen ermittelt:

Theoretische Berechnung der Molarität der CD83^{ext} Lösung:

$$c_{\text{CD83ext}} [\mu\text{g/ml}] / M_{\text{CD83ext}} [\mu\text{g/mol}] = c_{\text{CD83ext}} [\text{mol/ml}]$$

$$c_{\text{CD83ext}} [\text{mol/ml}] \cdot V_{\text{CD83ext}} [\text{ml}] = n_{\text{CD83ext}} [\text{mol}]$$

Theoretische Berechnung der Molarität vom SA-PE

$$c_{\text{SA-PE}} [\text{mg/ml}] / M_{\text{SA-PE}} [\text{mg/mol}] = c_{\text{SA-PE}} [\text{mol/ml}]$$

Berechnung des benötigten Volumens an SA-PE

$$n_{\text{CD83ext}} [\text{mol}] / c_{\text{SA-PE}} [\text{mol/ml}] = V_{\text{SA-PE}} [\text{ml}]$$

$$V_{\text{SA-PE}} [\text{ml}] / 4 = V_{\text{benötigt SA-PE}} [\text{ml}]$$

$M_{\text{CD83ext}} \approx 30.000 \text{ Da} = 30.000 \text{ g/mol} = 3 \cdot 10^{10} \text{ } \mu\text{g/mol}$ (Nur Näherung, da Tripelbande)

c_{CD83ext} abgeschätzt aus Coomassie Gel

V_{CD83ext} Volumen zum Zeitpunkt der Probennahme für die Gelelektrophorese

$M_{\text{SA-PE}} \approx 292.800 \text{ Da} = 292.800 \text{ g/mol} = 292,8 \cdot 10^6 \text{ mg/mol}$

$c_{\text{SA-PE}} = 1 \text{ mg/ml}$

Die benötigte SA-PE Menge wurde in 7-10 Einzelportionen zu $\text{CD83}^{\text{biot}}$ zupipettiert. Die Probe, die sich in Eppendorf Cups befand, wurde zwischen den einzelnen Zugaben für 10 min bei 4°C rotiert.

Wurde das CD83^{tet} :SA-PE mit Zentrifugenfilterröhrchen (Spin-X) sterilfiltriert, war eine Lagerung von ca. 1 Woche bei 4°C möglich. Für diesen Zeitraum wurde kein Proteaseinhibitor benötigt. Die Bindungsfähigkeit in der durchflusszytometrischen Analyse war auch nach einer Woche noch erhalten.

Um das CD83-Fusionsprotein auch zur Detektion eines möglichen Liganden auf dem Western Blot einsetzen zu können, wurde es mit SA-HRP konjugiert.

Berechnung und Tetramerisierung erfolgten analog dem SA-PE. Für die Berechnung wurde für SA-HRP eine Konzentration von $4,9 \cdot 10^{-9} \text{ mol/ml}$ (persönliche Kommunikation mit Amersham) zugrunde gelegt. Das tetramerisierte CD83-Fusionsprotein wird im weiteren Verlauf der Doktorarbeit als CD83^{tet} :SA-PE respektive CD83^{tet} : SA-HRP bezeichnet.

3.9 Durchflusszytometrische Analyse mit CD83^{tet}:SA-PE

3.9.1 Probenvorbereitung PBMC, Monozyten und DC

Siehe Abschnitt: 3.5.

3.9.2 Gewebeproben

Restgewebe von humanem Thymus und Lymphknoten die bei chirurgischen Eingriffen entnommen werden mussten, wurden unserem Labor im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Eva Tolosa (Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen) zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 242/2004V vom 6.08.2004).

3.9.3 Probenvorbereitung Thymozyten

Das Thymusgewebe wurde so bald wie möglich nach Entnahme weiterverarbeitet. Bis dahin wurde es in RPMI 1640 Medium bei 4°C gelagert. Das Thymusgewebe wurde zum Vereinzeln der Zellen durch einen Cell Strainer mit einer Maschenweite von 70 µm gedrückt. In zwei Waschschrritten wurden jeweils 30 ml PBS zugegeben und dann wurde bei 400 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Anschließend konnten die Thymozyten durchflusszytometrisch analysiert werden.

Apoptoseinduktion mit Dexamethason:

Zur Apoptoseinduktion wurden die vereinzelt Thymozyten über Nacht mit 1 µM Dexamethason (DEX1) in

RPMI 1640

10% FCS (hitzeinaktiviert)

2 mM Glutamin

100 IE/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin

bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Alternativ wurde Thymozyten mit 2,5 µM Dexamethason für 4 h inkubiert.

3.9.4 Probenvorbereitung Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden analog dem Thymus aufbereitet (Abschnitt 3.9.3). Es wurde jedoch nicht nur nativer Lymphknoten untersucht, sondern alternativ auch Lymphknoten, der in Formalinlösung sofort nach der Entnahme fixiert worden war.

3.9.5 Durchflusszytometrische Analyse

$2 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden zweimal mit 2 ml HBSS gewaschen und bei 400 g für 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden zum Färben in 100 μ l HBSS aufgenommen. Gefärbt wurde mit ca. 10 μ l CD83^{tet}:SA-PE (Dieser Wert variierte, und wurde für jede Präparation überprüft und gegebenenfalls angepasst. Er entsprach ungefähr einer Menge an CD83-Fusionsprotein zwischen $3 \cdot 10^{-13}$ und $5 \cdot 10^{-12}$ mol). Als Negativkontrolle wurde SA-PE in äquivalenter Menge eingesetzt, wie für das Tetramerisieren von CD83^{biot} verwendet wurde. Gegengefärbt wurde, je nach Versuch, mit α CD4, α CD8, α CD45, α CD14, α CD56, α CD19 Antikörpern, in den Farben FITC (je 5 μ l) oder APC (je 1 μ l), und mit Annexin V-FITC (siehe unten). Inkubiert wurde 10 – 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde zweimal mit je 2 ml HBSS gewaschen und die Proben dann in 200 μ l HBSS aufgenommen. Im Rahmen der Optimierung dieser Färbung wurde HBSS in manchen Experimenten mit 2% FCS oder 0,5% Polyglobin supplementiert.

Zur Überprüfung der Zellvitalität wurde mit Annexin V-FITC (Annexin-V-Fluos Staining Kit) oder Propidiumiodid (PI) gefärbt. Annexin V-FITC wurde zuerst mit dem speziell für diese Färbung mitgelieferten Puffer gefärbt. Vergleichsfärbungen bei verschiedenen Bedingungen zeigten jedoch, dass auch eine Färbung in HBSS bei Raumtemperatur möglich war, so dass Annexin V-FITC (0,5-1 μ l) unter den gleichen Bedingungen wie CD83^{tet}:SA-PE gefärbt werden konnte. 1-2 μ l PI wurde unmittelbar vor der FACS-Messung zupipettiert.

Die durchflusszytometrische Analyse wurde an einem FACS-Calibur-Gerät durchgeführt. Hierbei wurde die FITC-Fluoreszenz im FL1-Kanal, die PE-Fluoreszenz

im FL2-Kanal, die APC-Fluoreszenz im FL4-Kanal und Propidiumiodid im FL3-Kanal gemessen. Die Daten wurden mit der CellQuest Software (Version 3.1) ausgewertet. Eine gleichzeitige Messung der CD83^{tet}:SA-PE-Fluoreszenz und der Propidiumiodid-Fluoreszenz war nicht möglich, da sich die beiden Emissionsspektren stark überlappen, und so eine Kompensation bei der späteren Auswertung mit diesem FACS-Gerät und der vorhandenen Software nicht möglich war.

3.10 CD83L-Expression auf T-Zelllinien

3.10.1 Zellkultur humaner T-Zelllinien

Die T-Zelllinien Jurkat (Schneider et al., 1977) und CEM (Foley et al., 1965) wurden auf ihre CD83L-Expression untersucht. Die Zelllinie Jurkat war ein Geschenk von der Arbeitsgruppe PD Dr. Peter Brossart (Medizinische Universitätsklinik, Tübingen). Die Zelllinie CEM wurde von Dr. Ingo Müller für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Bei beiden Zelllinien konnte der Ligand durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Die CEM-Zellen erwiesen sich jedoch als geeigneter, da diese im apoptotischen Zustand weniger Eigenfluoreszenz zeigten, und sich die FACS-Analysen genauer auswerten ließen. Diese Zelllinien wurden in

RPMI 1640

10% FCS (hitzeinaktiviert)

2 mM Glutamin

100 IE/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin

bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

3.10.2 Apoptoseinduktion mit Staurosporin

Die CEM-Zellen wurden am Vorabend mit einer Dichte von 500.000 Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung in einer 6-Lochplatte angesetzt. Am Versuchstag wurde pro Vertiefung 20 µl einer 500 µM Staurosporinlösung zugegeben, was einer Endkonzentration von 5 µM Staurosporin entsprach. Dann wurde für 3 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt.

3.10.3 Inhibierung der *N*-Glykosylierung mit Tunicamycin

Zur Inhibierung des *N*-Glykosylierungswegs wurden die CEM-Zellen 2 oder 5 Tage mit Tunicamycin behandelt. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Behandlung im Verhältnis 1: 4 gesplittet. Wurde 2 Tage behandelt, so wurde eine Konzentration von 30 µg/ml Tunicamycin eingesetzt. Wurde 5 Tage behandelt, so wurde in den ersten 2 Tagen 10 µg/ml Tunicamycin eingesetzt, am 3. Tag wurde das Medium gewechselt. Hierzu wurde $\frac{3}{4}$ des Mediums, und somit auch der Zellen, abgesaugt und frisches Medium, welches 30 µg/ml Tunicamycin enthielt, zugegeben.

Um die Zellen zu stressen und somit eine CD83L-Expression nachweisen zu können, wurden die CEM-Zellen einem 2-stündigen Hitzeschock bei 42 °C unterworfen. Die Zellen wurden hierzu in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad gestellt.

3.10.4 Durchflusszytometrische Analyse der CEM-Zellen

Gefärbt wurde in Anlehnung an das unter Abschnitt 3.9.5 beschriebene Färbeprotokoll für die durchflusszytometrische Analyse. Jedoch erwiesen sich bei den einzelnen Versuchen unterschiedliche Färbebedingungen als besonders geeignet. So wurde bei diesen Versuchen nicht mit einheitlichen Bedingungen gefärbt, sondern die Färbebedingungen wurden individuell festgelegt (Anmerkung: Die Waschschriffe wurden jeweils im gleichen Medium durchgeführt wie die Färbungen). Die einzelnen Färbebedingungen werden im Folgenden tabellarisch dargestellt. Im Ergebnisteil werden bei den Schaubildern der CEM-Zellen die jeweiligen Bedingungen angegeben

Färbebedingung Nr.	Zeit	Temperatur	Medium
1	10 min	Raumtemperatur	HBSS
2	30 min	4 °C	HBSS mit 2% FCS
3	30 min	Raumtemperatur	RPMI ohne Phenolrot mit 5% FCS

3.11 Glycan Array

Ein Glycan Array mit rekombinant exprimiertem, biotinyliertem CD83-Fusionsprotein wurde in Kooperation mit dem Consortium for Functional Glycomics Core H, Oklahoma City (OK, USA) von Prof. Dr. Richard Alvarez durchgeführt.

Die Bedingungen waren wie folgt:

Plate: Pierce 384 well HBC NeutrAvidin Black #15513

Glycan Array version: v2.3

Ligand coating: 30pmol/well

Ligand coating volume: 25µl

Lectin coating: 0.81µg/ml

Lectin coating volume: 25µl

Secondary detection: Streptavidin-FITC

Secondary concentration: 5µg /ml

Secondary volume: 25µl

Wash buffer: PBS

Binding buffer: PBS

3.12 CD83L-Charakterisierung durch Western Blot und ESI-MS

3.12.1 Western Blot mit lysierten Thymozyten

Lyse der Thymozyten:

$10 \cdot 10^6$ Thymozyten wurden in 1 ml eiskalten Lysepuffer aufgenommen und im „Tissue Grinder“ durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen des Stößels (loose fit), und anschließender 10-minütiger Inkubation auf Eis lysiert. Im darauf folgenden Zentrifugationsschritt (12.000 g; 25 min, 4°C) wurden die löslichen, zytosolischen Proteine von den unlöslichen Proteinen der Membran und des Zellkerns abgetrennt. Das Pellet wurde anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die lösliche Fraktion wurde im Verhältnis 1:1 mit Loading Buffer/DTT (2/3 Loading Buffer (4x) und 1/3 DTT (0,93g/ml)) versetzt und 5 min bei 98°C erhitzt. Die unlösliche Fraktion wurde in 1,5 ml Loading Buffer/DTT aufgenommen und 10 min bei 98 °C erhitzt. Da die Lösung

durch die DNA recht zähflüssig war, wurde sie mehrmals mit Hilfe einer Spritze durch eine Kanüle (21G) gezogen

Lysepuffer:

10 mM HEPES

1% Triton X-100

in 10 ml PBS

1 Tablette Protease Inhibitor „Complete Mini EDTA-free“

Zum Laden des Gels wurden 10 und 15 µl der vorbereiteten Proben vorsichtig in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Als Marker wurden Rainbow coloured molecular weight marker aufgetragen.

Verwendetes Gel: 10% Bis-Tris-Gel

Bei 150V (V=konstant) wurde 80 min elektrophoriert.

Gel, Nitrocellulosemembran und Blottingpapiere wurden in Transferpuffer für 5 min äquilibriert. Geblottet wurde in einer Semi Dry Transfer Cell. Für eine Membran von 60 cm² wurde für eine Stunde eine Stromstärke von 0,06 A (I = konstant) benötigt. Die Membran wurde im Anschluss für 5 min in Ponceau Lösung fixiert, mit Wasser abgewaschen und dann für 5 min in TBS äquilibriert. Blockiert wurde in 2% boviner Albuminlösung in TBS (Dauer: ca. 3 h). Nach dem Blockieren folgten zwei 5-minütige Waschschrte mit TBST. Anschließend wurde über Nacht mit CD83^{tet}:SA-HRP (entsprechend ca. $2 \cdot 10^{-11}$ mol CD83^{ext} auf 8 ml TBST) bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente die äquivalente Menge an SA-HRP. Alternativ wurde in TBST welches 100 mg/l CaCl₂ enthielt inkubiert.

Nach der Inkubation mit Antikörperlösung wurde viermal 10 min mit TBST gewaschen und die Membran dann mit ca. 6 ml einer 1:1 Mischung von Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution und Super Signal West Pico Stable Peroxidase Solution beträufelt. Nach 5 min Reaktionszeit wurde die Membran in Folie eingeschweißt und damit ein X-omat AR Film 15 s bis 1 min belichtet. Dieser Film wurde anschließend automatisch in der Classic E.O.S. Filmentwicklungsmaschine entwickelt.

Ponceau-Rot Lösung:

0,01% (v/v) Essigsäure

0,15% (w/v) TCA

0,15% (w/v) Sulfosalicylsäure

0,2% (w/v) Ponceau-Rot

in dH₂O

3.12.2 ESI-MS

Zur Proteinidentifizierung wurde das Gel nach der Coomassie-Methode (siehe Abschnitt 3.8.11) gefärbt. Die gewünschte Bande wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Stevanovic (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen) mit Hilfe der ESI-MS-Sequenzierung (Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie) identifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Lektinfärbungen

4.1.1 Konjugation von MAL II und Ermittlung der optimalen Färbebedingungen für MAL II und SNL

Um die Gegenwart von Sialinsäure als terminalem Kohlenhydrat in Glykanen auf der Oberfläche von T-Zellen sowie DC zu untersuchen, wurden zwei pflanzliche Lektine verwendet:

- *Maackia amurensis* Lektin II (MAL II, selektiv für α 2,3-verknüpfte Sialinsäure)
- *Sambucus nigra* Lektin (SNL, selektiv für α 2,6-verknüpfte Sialinsäure)

Das jeweilige Lektin erkennt in der Regel nicht nur eine Sialinsäurebindung sondern mit geringerer Affinität noch weitere. Man muss deshalb von einer Selektivität statt von einer Spezifität sprechen. Darüber hinaus sind Lektine Naturprodukte, die Schwankungen unterliegen können. Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die optimalen Färbebedingungen an unstimulierten PBMC untersucht. In der durchflusszytometrischen Analyse sollte eine optimale Trennung von „hoch-“ und „niedrig-“ färbenden Populationen zu sehen sein. Des Weiteren wurde für jede Charge die optimale Färbekonzentration bestimmt.

In der Abbildung 4.1 soll beispielhaft dargestellt werden wie sich die Konzentration auf das Ergebnis auswirkt. Als optimale Färbebedingung erwiesen sich 10 min bei Raumtemperatur und eine Menge von 1-2 μ l MAL II-FITC (auf 100 μ l Färbevolumen) (siehe 3.5.4).

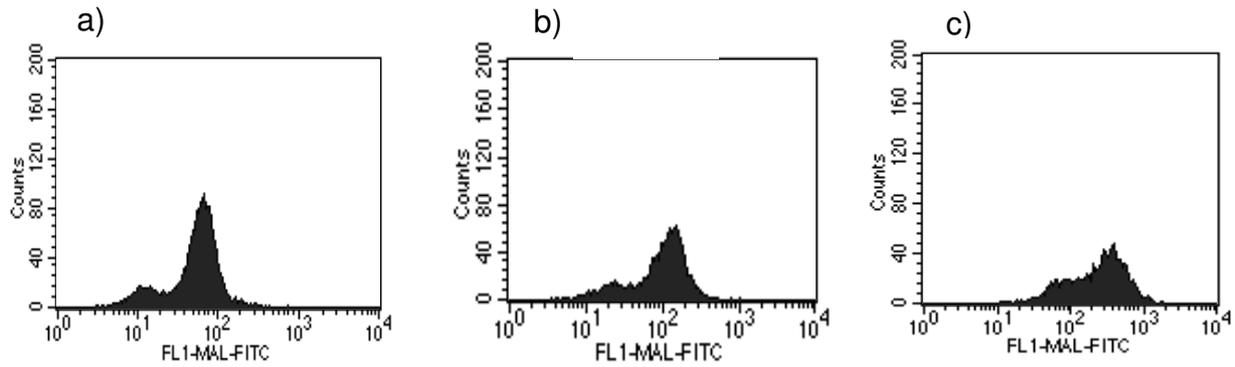


Abbildung 4.1: PBMC gefärbt mit MAL II-FITC a) einfache Konzentration (2 μ l), b) 2,5-fache Konzentration und c) 10-fache Konzentration. Die unspezifische Bindung nahm konzentrationsabhängig zu.

4.1.2. Sialylierung auf reifen und unreifen Dendritischen Zellen

Eine Veränderung der Glykosylierung und vor allem der Sialylierung korreliert bei T-Zellen mit funktionellen Veränderungen. Für DC gibt es bisher hierzu keine Daten. Die DC für diesen Versuch wurden aus immunomagnetisch positiv selektionierten Monozyten aus Peripherblut generiert. Hierzu wurden die CD14⁺ Monozyten mit IL-4 und GM-CSF behandelt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen gesplittet, zu einem Teil wurde ein proinflammatorischer Zytokincocktail zugegeben und die unreifen DC wurden dadurch gereift, der andere Teil blieb unbehandelt, so dass man reife und unreife DC direkt miteinander vergleichen konnte.

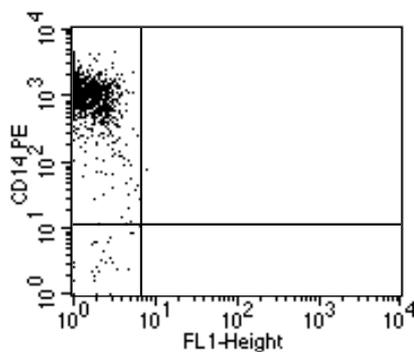


Abbildung 4.2: Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der MACS-Aufreinigung von Monozyten. Durchschnittlich konnte eine Reinheit von 95% CD14⁺ Zellen erreicht werden.

Die Umwandlung von Monozyten zu DC konnte anhand der Abnahme von CD14 am FACS verfolgt werden (Abbildung 4.3). Nach 5 Tagen waren noch ca. 1% der Zellen CD14 positiv. Nach 7 Tagen nur noch 0,4%. Die Dichte an CD83, einem Marker für reife DC war bei DC die mit dem Zytokincocktail gereift worden waren deutlich höher

Ergebnisse

im Vergleich zu ungereiften DC (Abbildung 4.4b). Auch für CD86 konnte eine Heraufregulierung auf reifen DC im Vergleich zu nicht gereiften DC beobachtet werden (Abbildung 4.4a).

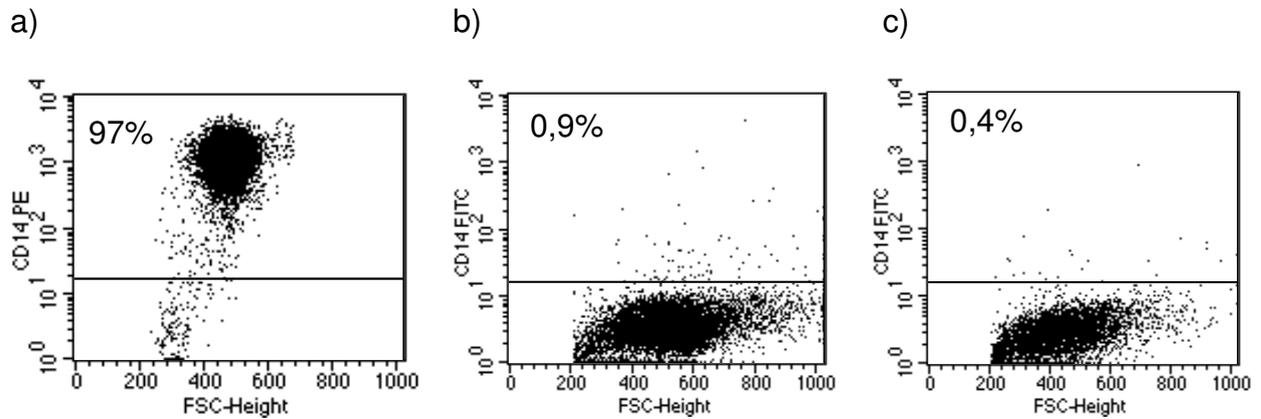


Abbildung 4.3: Abnahme der CD14 Expression während der Reifung von Monozyten zu DCs. a) am Tag der Aufreinigung, b) am 5. Tag, c) am 7. Tag.

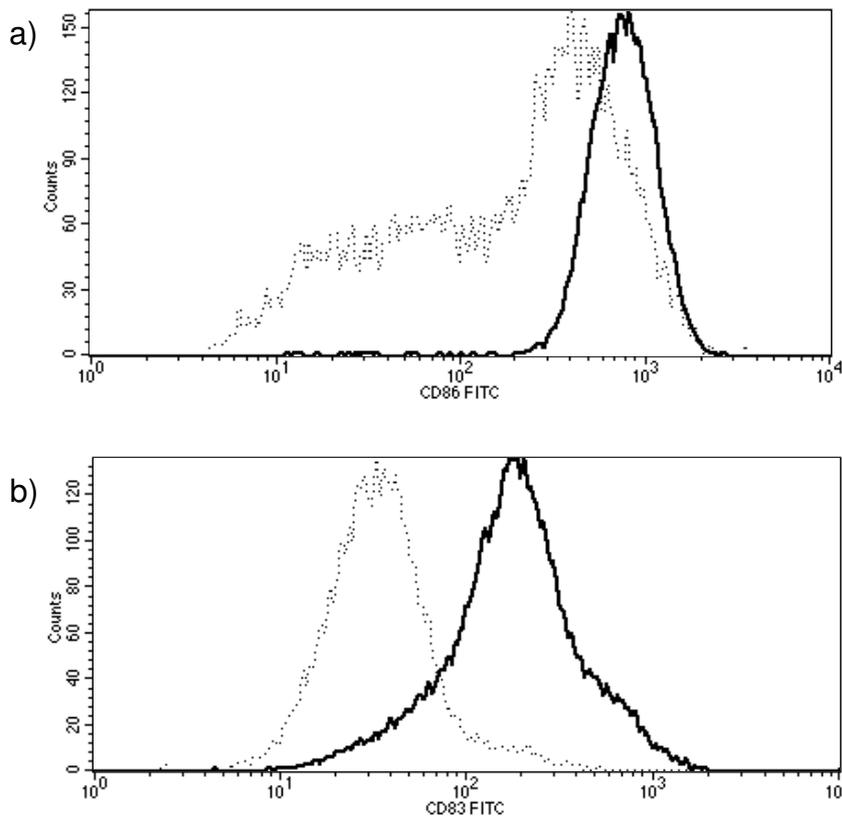


Abbildung 4.4: a) CD86-Expression, b) CD83-Expression auf unreifen DC (Tag 5, gepunktete Linie) und auf reifen DC (Tag 7, durchgezogene Linie).

In Bezug auf das Sialylierungsmuster gab es signifikante Unterschiede. Während sich die Bindung an MAL II-FITC zwischen reifen und unreifen DC nicht unterschied, konnte man bei den reifen DC eine eindeutige Abnahme der Bindung an SNL-FITC feststellen (Abbildung 4.5). Während also die Dichte an Sialinsäuren in α 2,3-Bindung unverändert blieb, nahm die Dichte an Sialinsäuren in α 2,6-Bindung bei reifen DC im Vergleich zu unreifen DC eindeutig ab. Es wurden unreife DC am Tag 5 (ohne Abbildung) und Tag 7 (Abbildung 4.5) untersucht, für beide konnte eine höhere Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure im Vergleich zu reifen DC durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

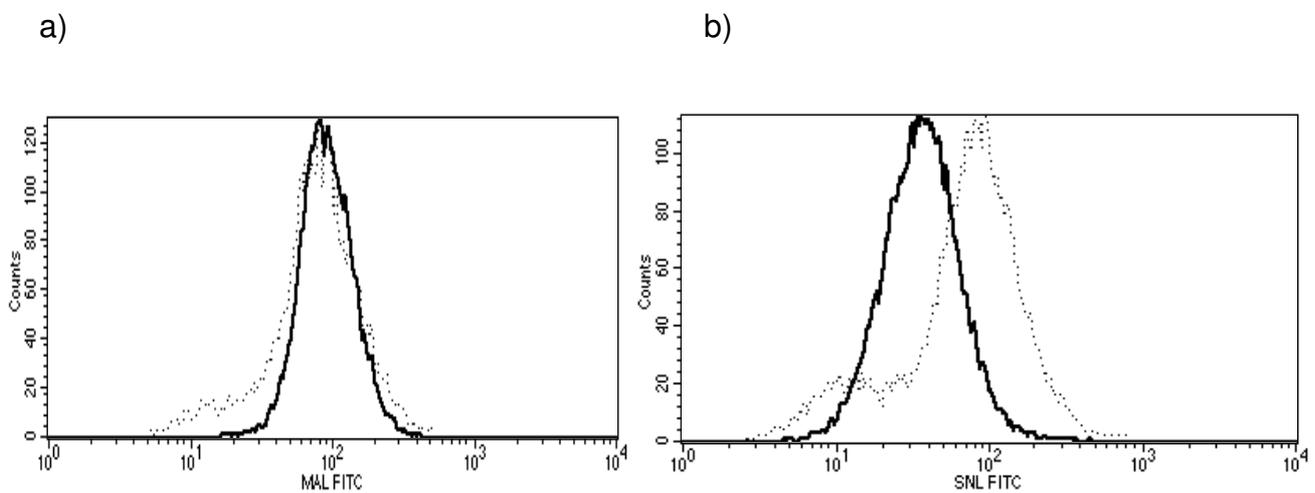


Abbildung 4.5: a) Dichte α 2,3-gebundener Sialinsäure auf unreifen (Tag 7, gepunktete Linie) und reifen (Tag 7, durchgezogene Linie) DC; b) Dichte α 2,6-gebundener Sialinsäure auf unreifen (Tag 7, gepunktete Linie) und reifen (Tag 7, durchgezogene Linie) DC.

4.1.2 Sialylierung von PBMC

Welchen Einfluss hat die polyklonale Stimulierung via TCR und IL-2 auf das Sialylierungsmuster? Zur Beantwortung dieser Frage wurden PBMC und die Subpopulationen CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺CD25⁺ sowie CD4⁺CD25⁻ untersucht. Die Subpopulationen wurden immunomagnetisch aufgereinigt. Abbildung 4.6 zeigt die FACS-Analyse einer typischen Aufreinigung.

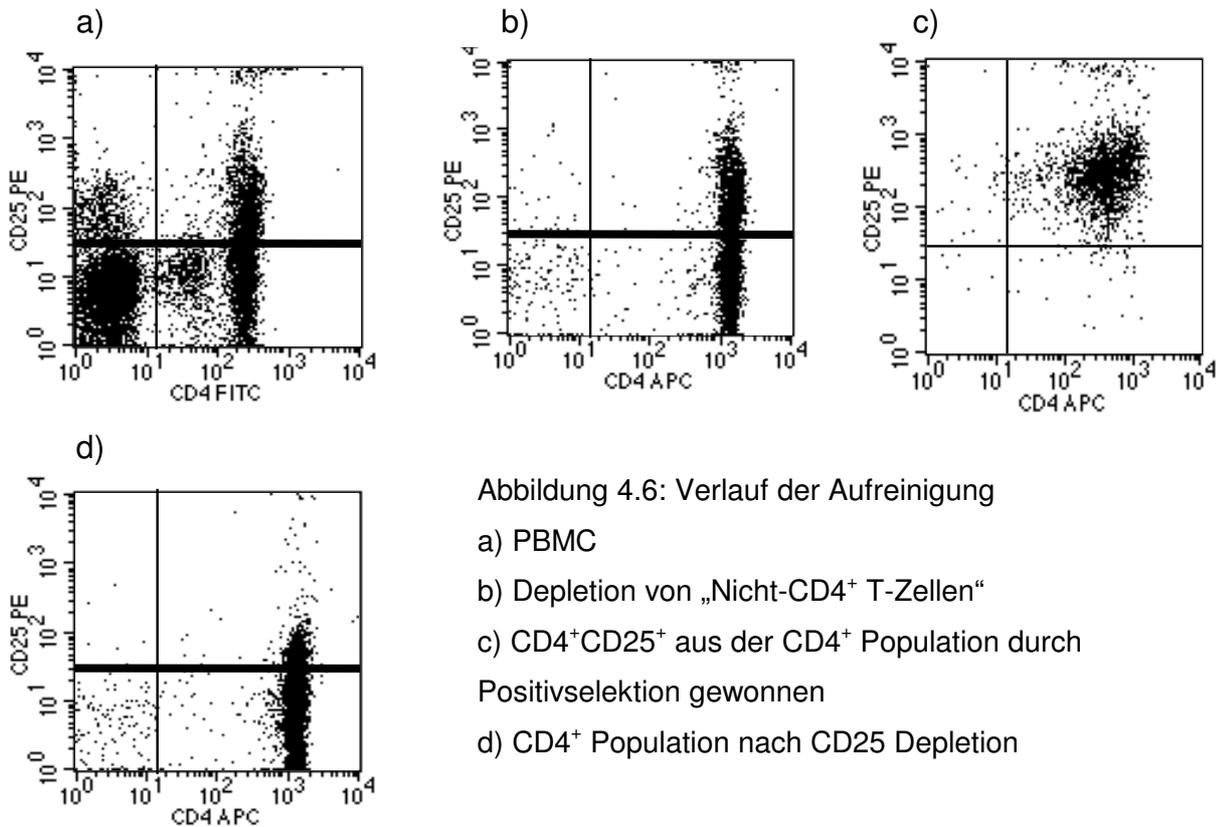


Abbildung 4.6: Verlauf der Aufreinigung

- a) PBMC
- b) Depletion von „Nicht-CD4⁺ T-Zellen“
- c) CD4⁺CD25⁺ aus der CD4⁺ Population durch Positivselektion gewonnen
- d) CD4⁺ Population nach CD25 Depletion

Die CD4⁺ Zellen waren typischerweise zu 97% rein, bei den CD4⁺CD25⁺ Zellen wurde eine Reinheit von ca. 96% erreicht, bei der CD8⁺ Population konnten Reinheiten von ca. 98 % erreicht werden (ohne Abbildung). Obwohl für die CD25-Depletion die Zellen über zwei Säulen aufgereinigt wurden, konnten nur die CD25 „hochpositiven“ Zellen entfernt werden.

Das Sialylierungsmuster von PBMC und den aufgereinigten Subpopulationen wurde untersucht auf:

- frisch isolierten Zellen,
- Zellen, die eine Woche mit plattengebundenem OKT3, IL-2 und bestrahlten, allogenen PBMC stimuliert worden waren,
- und in manchen Fällen Zellen, die zwei Wochen mit plattengebundenem OKT3, IL-2 und bestrahlten, allogenen PBMC stimuliert worden waren.

Der Erfolg des jeweiligen Versuches hing stark von den Kulturbedingungen und der Reinheit der isolierten Zellen ab. Waren z. B. in den CD4⁺ Zellen nach CD25-Depletion noch zu viele CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen, so kam es zu einem abweichenden Ergebnis.

Sialinsäuredichte auf PBMC

PBMC wurden mit OKT3 und IL-2 stimuliert. Während die Sialinsäuredichte in α 2,3-Bindung keine größeren Änderungen zeigte (Abbildung 4.7b), ergab sich bei den Färbungen mit SNL ein anderes Bild. Nach einer Woche zeigte sich eine deutliche Heraufregulierung der α 2,6-gebundenen Sialinsäure (Abbildung 4.7a). Durch elektronisches Gaten bei der Auswertung ergaben sich bei diesem Versuchsaufbau keine bedeutenden Unterschiede zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ Populationen (ohne Abbildung).

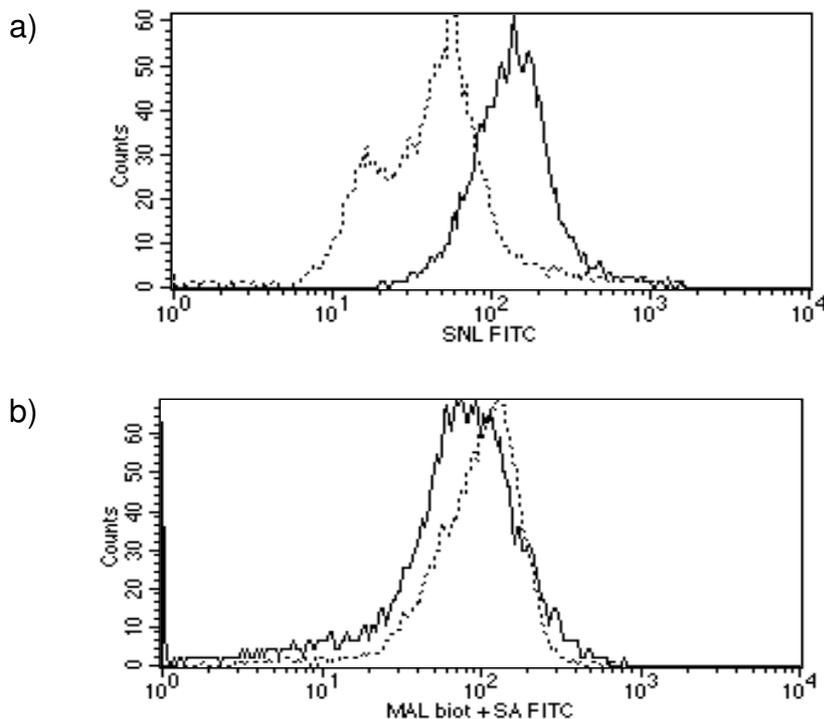


Abbildung 4.7: PBMC frisch isoliert (gepunktete Linie), 1 Woche stimuliert (durchgezogene Linie); a) Dichte an α 2,6-verknüpfter Sialinsäure (gefärbt mit SNL-FITC), b) Dichte an α 2,3-verknüpfter Sialinsäure (gefärbt mit MAL II-biot und SA-FITC).

Sialinsäuredichte auf isolierten Populationen

Für zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen ergab sich ein völlig anderes Bild, wenn diese Zellen erst isoliert und dann stimuliert wurden. Hier zeigte sich eine Erniedrigung der Sialinsäure in α 2,6-Bindung (Abbildung 4.8). Diese Erniedrigung war unabhängig von bestrahlten allogenen PBMC in der MLR. Die Veränderungen in der α 2,3-Sialylierung

waren heterogener und spenderabhängig. Nach Stimulierung der isolierten CD8⁺ T-Zellen konnte eine niedrigere oder gleich bleibende Dichte an α 2,3-gebundener Sialinsäure beobachtet werden, aber niemals eine höhere Dichte (Abbildung 4.9).

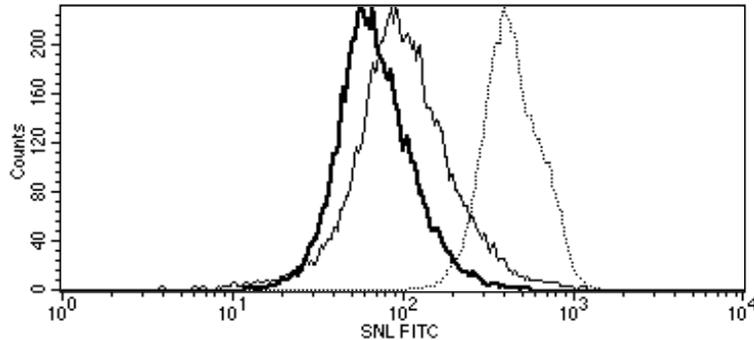


Abbildung 4.8: SNL-FITC Färbung von CD8⁺ T-Zellen: frisch isoliert (gepunktete Linie), 1 Woche stimuliert (dünne Linie), 2 Wochen stimuliert (dicke Linie). Die Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure nahm durch Stimulation ab (MLR ohne allogene Stimulatoren).

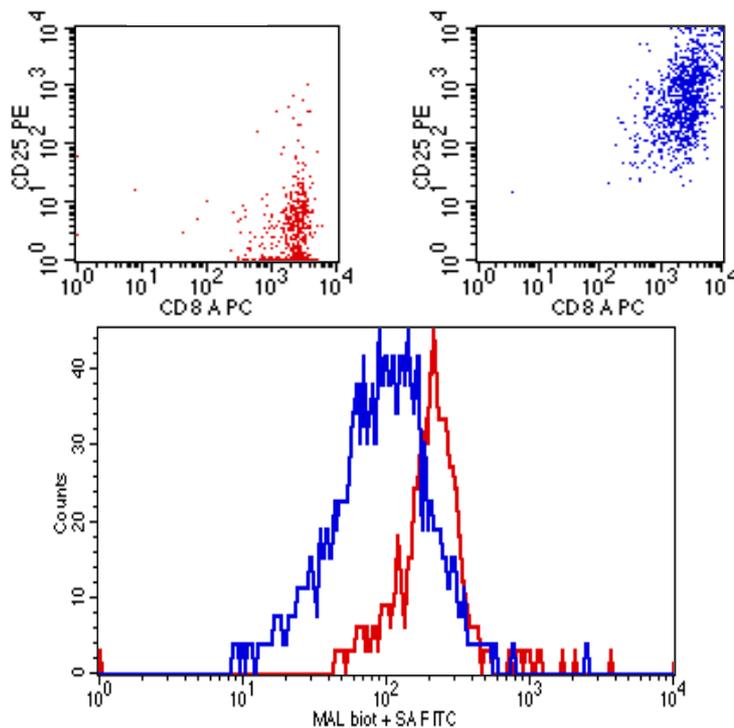


Abbildung 4.9: Durchflusszytometrische Analyse von CD8⁺ T-Zellen: frisch isoliert (rot) und nach 1-wöchiger Stimulation (blau, MLR mit allogeenen Stimulatoren). Obere Reihe: Gefärbt mit α CD8-APC und α CD25-PE. Deutliche Zunahme der Dichte des Aktivierungsmarkers CD25. Untere Reihe Histogramm: Die Dichte an α 2,3-gebundener Sialinsäure (gefärbt mit MAL II-biot und SA-FITC) nahm durch Stimulation leicht ab.

Bei CD4⁺ Zellen, die auch die CD4⁺CD25⁺ positiven T-Zellen und somit auch die regulatorischen Zellen enthielten, zeigten sich innerhalb der frisch isolierten Zellen zwei distinkte Populationen, wovon sich eine SNL^{hoch} und die andere SNL^{niedrig} präsentierte. Nach einer und besonders nach zwei Wochen stellten sich alle Zellen SNL^{hoch} dar, das heißt mit hoher Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure (Abbildung 4.10). Wie für die CD8⁺ Zellen in Abbildung 4.9 dargestellt, so waren auch die CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit OKT3 und IL-2 CD25 positiv (ohne Abbildung). In Bezug auf MAL II ergab sich durch die Stimulation keine Veränderung.

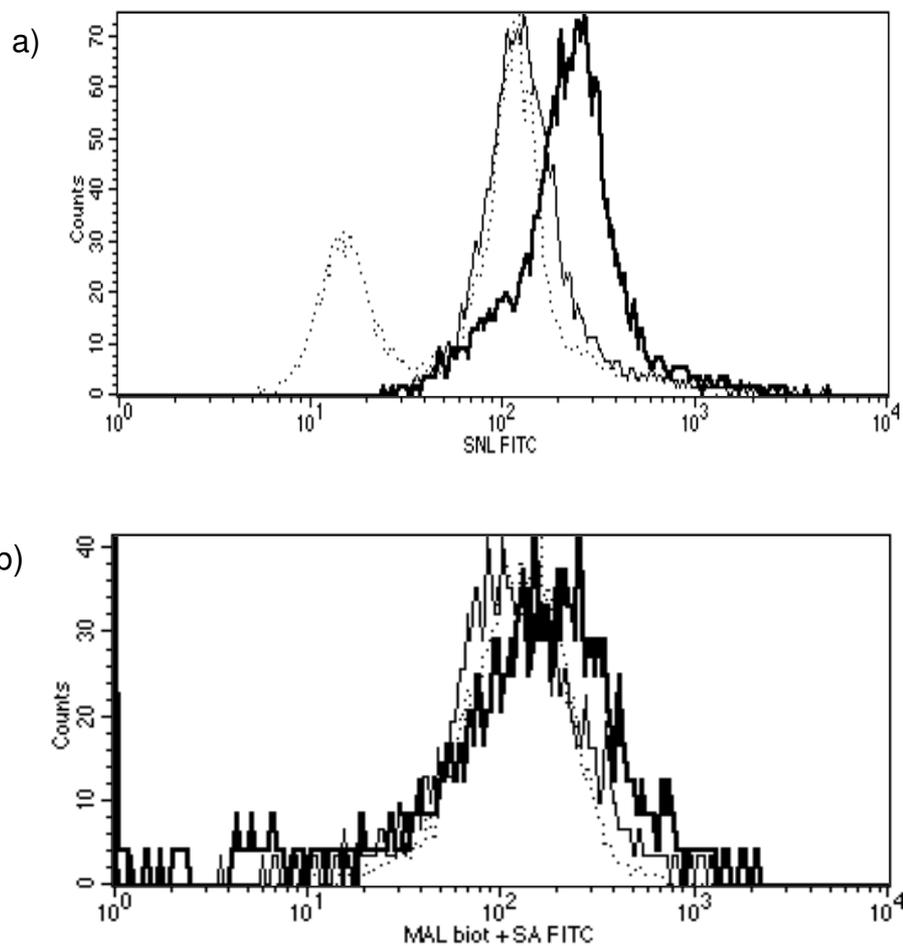


Abbildung 4.10: CD4⁺ Zellpopulation frisch isoliert (gepunktete Linie), 1 Woche stimuliert (dünne Linie) und 2 Wochen stimuliert (dicke Linie); a) α 2,6-verknüpfte Sialinsäure, Färbung mit SNL-FITC, b) α 2,3-verknüpfte Sialinsäure, Färbung mit MAL II-biotin und SA-FITC.

Es wird angenommen, dass nicht alle CD4⁺CD25⁺ T-Zellen regulatorische T-Zellen sind. Für natürliche T_{reg} ist aber noch kein einzelner eindeutiger Oberflächenmarker bekannt. Frisch isoliert zeigten sich zwei Populationen CD4⁺CD25⁺ PBMC: Eine mit niedriger und eine mit hoher Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure auf ihrer Oberfläche. Nach einer Woche Stimulation regulierten die Zellen diesen SNL-Liganden hoch, so dass sich alle Zellen SNL^{hoch} präsentierten (Abbildung 4.11).

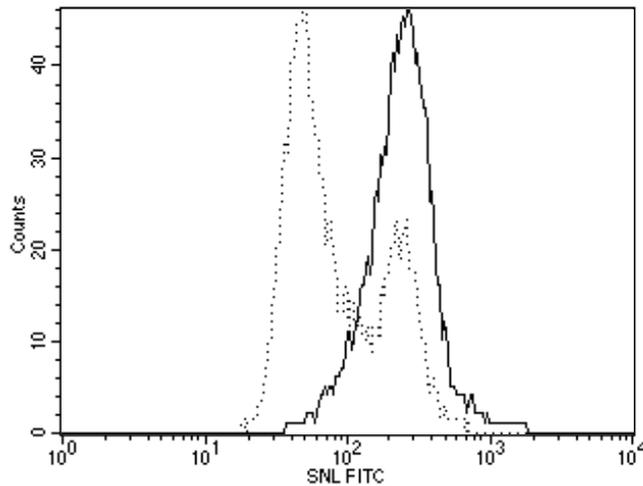


Abbildung 4.11: Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, Zellpopulation frisch isoliert (gepunktete Linie), 1 Woche stimuliert (durchgezogene Linie), durch Färbung mit SNL-FITC.

Depletion der regulatorischen T-Zellen verhindert die Heraufregulierung von α 2,6-verknüpfter Sialinsäure

Aus der Literatur ist bekannt, dass regulatorische T-Zellen ihre inhibitorischen Eigenschaften durch Zell-Zell-Kontakt auf andere CD4⁺ Lymphozyten übertragen können (Jonuleit et al., 2002). Deshalb wurde der Sialylierungsstatus von CD4⁺ Lymphozyten nach Stimulation in Abwesenheit von T_{reg} untersucht. Während CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von regulatorischen T-Zellen die Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure auf ihrer Oberfläche erhöhten (Abbildung 4.10), konnte für CD25-depletierte CD4⁺ T-Zellen das Gegenteil gezeigt werden. Hier kam es sogar zu einer leichten Verminderung der α 2,6-verknüpften Sialinsäure (Abbildung 4.12).

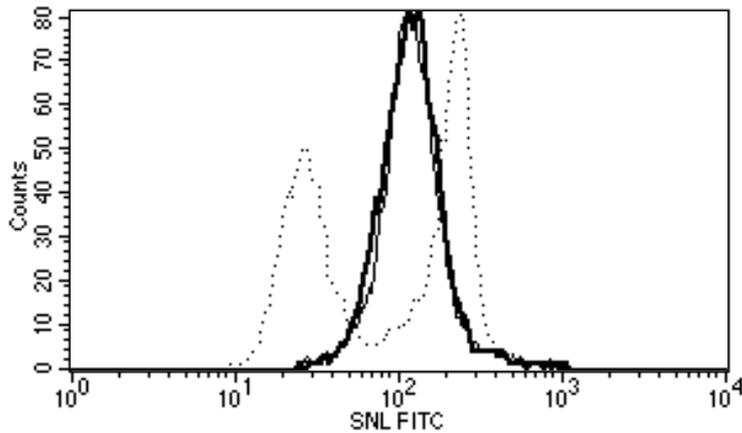


Abbildung 4.12: Dichte an α 2,6-verknüpfter Sialinsäure auf CD25-depletierte CD4⁺ T-Zellen frisch isoliert (gepunktete Linie), 1 Woche stimuliert (dünne Linie), 2 Wochen stimuliert (dicke Linie), durch Färbung mit SNL-FITC.

Lassen sich die SNL^{hoch} und SNL^{niedrig} Populationen durch andere Aktivierungsmarker unterscheiden?

Frisch aufgereinigte Zellen wurden auf drei Aktivierungsmarker untersucht, nämlich auf CD62L, CD69 und CD27. Das Ergebnis in Abbildung 4.13 zeigt, dass sich die Populationen bezüglich dieser Aktivierungsmarker gleich verhielten und sich durch diese nicht unterscheiden ließen. CD69 wird während den frühen Schritten der Aktivierung von Lymphozyten und Monozyten exprimiert. Frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen waren fast ausschließlich negativ für diesen Marker. SNL-FITC positive und negative CD4⁺ T-Zellen zeigten keinen Unterschied in der CD69-Positivität. CD62L (L-Selektin) wird nach Zellaktivierung rasch von der Oberfläche der Zellen abgespalten. Über 90% der analysierten CD4⁺ T-Zellen waren positiv für diesen Marker, was darauf schließen lässt, dass diese Zellen nicht aktiviert waren. CD27 wird auf peripheren T-Lymphozyten und medullären Thymozyten exprimiert und nach Aktivierung heraufreguliert. Es wird auch auf Subpopulationen peripherer B-Zellen exprimiert. Die untersuchten PBMC waren zu über 80% positiv für CD27. SNL positive und SNL negative Zellen zeigten keine Unterschiede in der Expression von CD62L und CD27. Die Untersuchung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auf diese Aktivierungsmarker gestaltete sich aufgrund geringer Zellzahlen bisher schwierig.

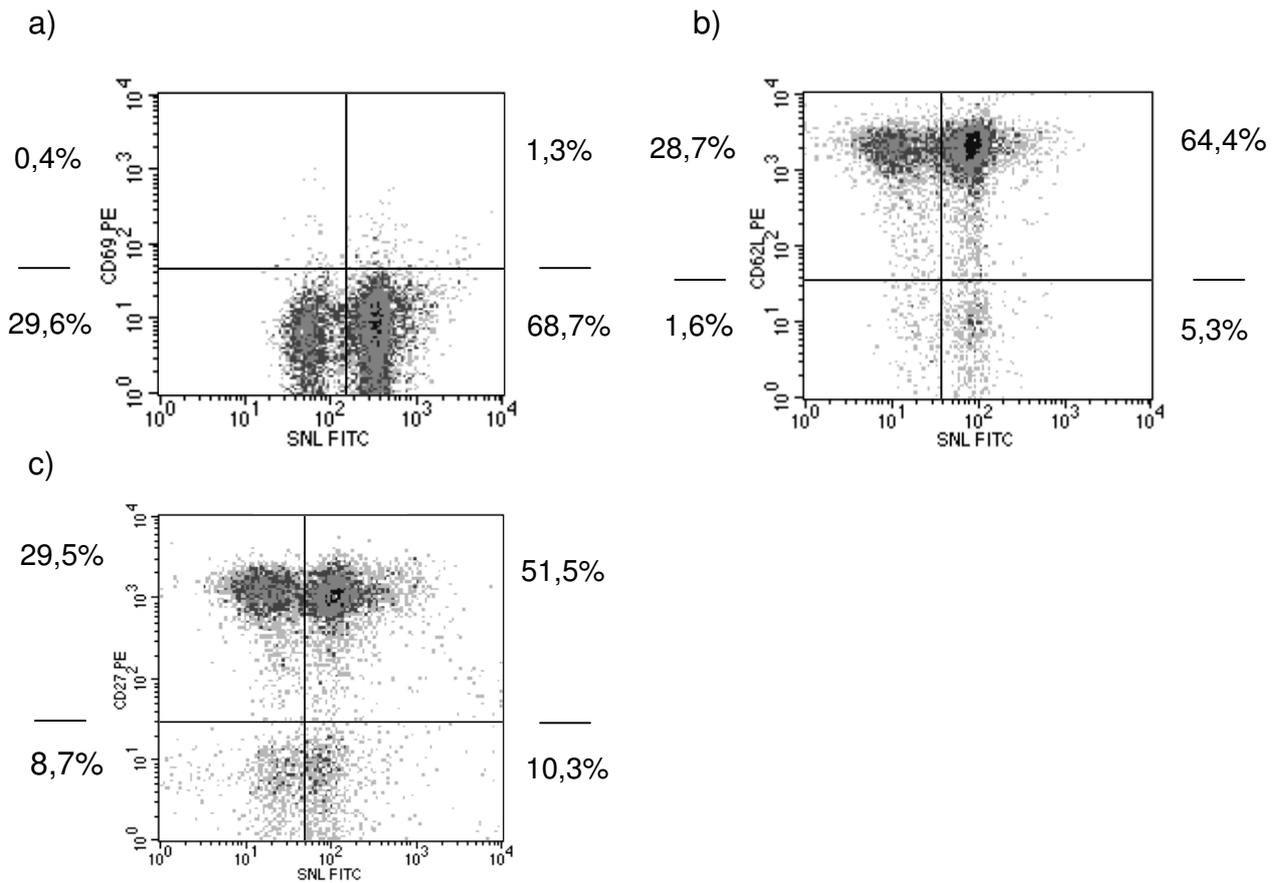
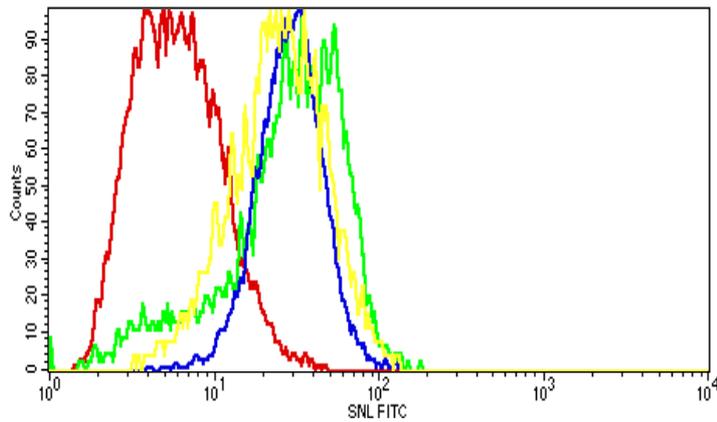


Abbildung 4.13: a) CD4⁺ T-Zellen gefärbt mit αCD69-PE und SNL-FITC, b) CD4⁺ T-Zellen gefärbt mit αCD62L-PE und SNL-FITC c) PBMC gefärbt mit αCD27-PE und SNL-FITC.

4.1.3 Sialylierung von Oberflächenproteinen auf Tumorzelllinien

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine höhere Dichte an α2,6-gebundener Sialinsäure auf der Oberfläche von Zellen mit einer toleranzinduzierenden Funktion zu finden ist (unreife DC und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen). Toleranzinduktion und T-Zellinhibition sind auch Mechanismen des so genannten Immune-Escape von Tumoren. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Änderungen in der Glykosylierung auf der Zelloberfläche frühe Zeichen maligner Entartung darstellen (Hakomori, 2002). Deshalb wurden verschiedene Tumorzelllinien auf ihre Sialinsäuredichte untersucht (Abbildung 4.14).

a)



b)

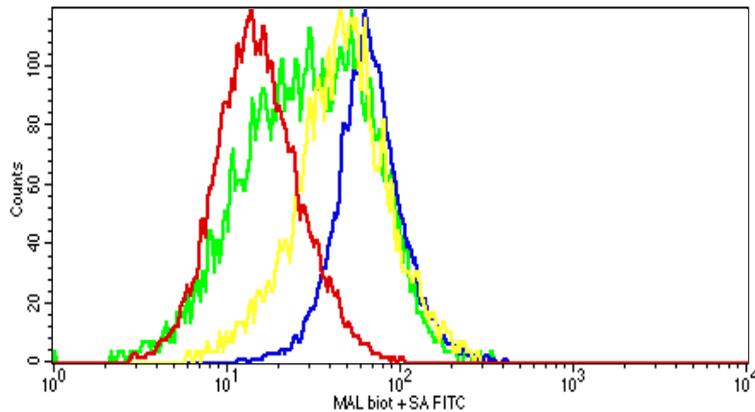


Abbildung 4.14: Sialylierung verschiedener Tumorzelllinien: rot: A204, grün: Hep G2, gelb: RD, blau: M21; a) gefärbt mit SNL-FITC, b) gefärbt mit MAL II-biot und SA-FITC.

A204 und RD sind humane Rhabdomyosarkom-Zelllinien, M21 ist die Zelllinie eines humanen Melanoms und Hep G2 die eines hepatozellulären Karzinoms. Alle untersuchten Tumorzelllinien trugen sowohl α 2,3-gebundene als auch α 2,6-gebundene Sialinsäure auf ihrer Oberfläche. Jedoch zeigten sich Unterschiede sowohl in Bezug auf die α 2,3- als auch die α 2,6-verknüpfte Sialinsäure zwischen den Tumorarten. Auch gab es signifikante Unterschiede bei Tumoren derselben Histologie (A204 und RD) (Abbildung 4.14). A204 zeigte von den untersuchten Zelllinien die niedrigste Sialinsäuredichte in der durchflusszytometrischen Analyse. Die Zelllinien Hep G2, RD und M21 zeigten kaum Unterschiede in der α 2,6-Sialylierung, jedoch war die α 2,3-Sialinsäuredichte bei den Zelllinien Hep G2 und RD geringer als bei M21.

Während einer Immunantwort gegen Tumoren werden in der Effektorphase TNF- α und IFN- γ freigesetzt. Diese Situation wurde *in vitro* nachgestellt und A204-Zellen wurden mit IFN- γ bzw. mit TNF- α und IFN- γ behandelt. Hierbei konnte eine leichte Heraufregulierung von α 2,6-gebundener Sialinsäure beobachtet werden (Abbildung 4.15).

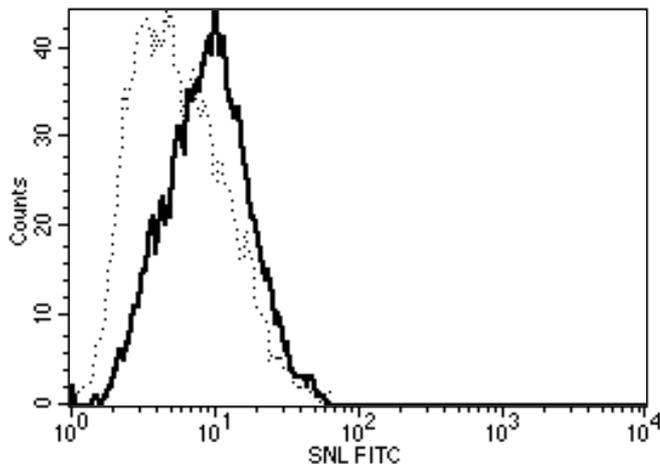


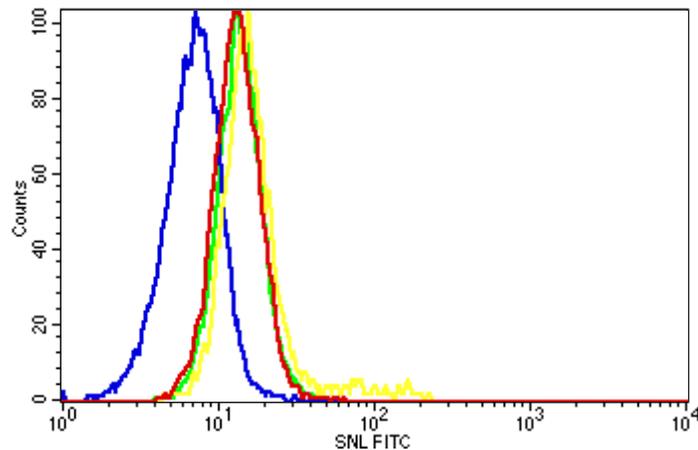
Abbildung 4.15: α 2,6 Sialylierung von A204-Zellen: unbehandelt (gepunktete Linie), mit IFN- γ behandelt (durchgezogene Linie).

4.1.4 Sialylierung auf Leukämie-Zelllinien

Bei der Untersuchung verschiedener Leukämie-Zelllinien zeigte sich deutlich, dass die α 2,3-Sialylierung mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Zelllinie abnahm (Abbildung 4.16). K562 präsentieren sich als relativ undifferenzierte Blasten. Ursprung dieser Zelllinie ist ein an chronisch myeloischer Leukämie erkrankter Patient im Blastenschub. Bei KG-1a handelt es sich um eine promyeloblastische Zelllinie. HL60 hat ihren Ursprung in einer akuten promyeloischen Leukämie. PLB-985-Zellen sind am weitesten ausdifferenziert. Hier handelt es sich um eine akute myeloische Leukämie (AML FAB Einteilung M4) (Tucker et al., 1987). Bei dieser Zelllinie wird allerdings spekuliert, ob sie ein Derivat von HL60 sein könnte (Drexler et al., 2003).

Die α 2,6-Sialylierung ist bei den drei erstgenannten Zelllinien gleich, hier zeigt nur PLB-985 einen deutlich niedrigeren Sialylierungsgrad.

a)



b)

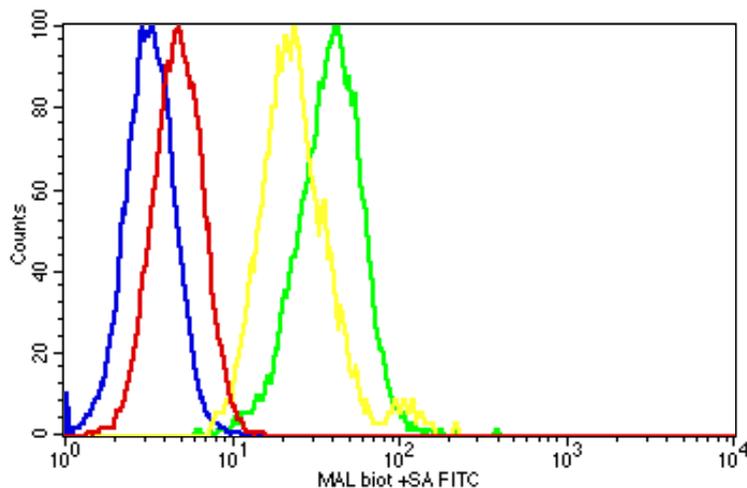


Abbildung 4.16: Sialylierung verschiedener Leukämie-Zelllinien: PLB-985: blau, HL60: rot, KG-1a: gelb, K562: grün; a) α 2,6-Sialylierung (Färbung mit SNL-FITC), b) α 2,3-Sialylierung (Färbung mit MAL II-biot und SA-FITC).

4.1.5 Das rekombinante Fusionsprotein Siglec-7

Bisher wurden pflanzliche Lektine verwendet, um Liganden für inhibitorische Sialinsäurerezeptoren (Siglecs) in erster Näherung zu detektieren. Diese Lektine haben jedoch wie schon erwähnt Nachteile. Zum Einen weisen sie eher eine

Selektivität als eine Spezifität auf, des Weiteren lassen sie sich nicht in funktionellen Assays einsetzen, da Lektine mehrere Bindungsstellen haben und somit Proteine quervernetzen können. Außerdem spielt bei der Affinität der Siglecs gegenüber den Sialinsäureliganden nicht nur die terminale Sialinsäure eine Rolle, sondern zusätzlich wird diese Bindung auch noch durch das darunterliegende Kohlenhydrat beeinflusst. Das Ziel war also, die Siglecs als rekombinante Fusionsproteine zu exprimieren um diese dann für FACS-Färbungen und weitere Versuche, wie z. B. Zytotoxizitätsassays, einsetzen zu können.

Da Siglecs selbst glykosyliert werden müssen, um sich korrekt zu falten und ihre Liganden zu erkennen, müssen die Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Um ein Glykosylierungsmuster möglichst nahe an dem des Menschen zu erhalten, werden dazu Säugetierzelllinien benutzt, wie z. B. COS-7, CHO-K1 oder 293. Der Expressionsvektor pcDNA3.1 verfügt über einen CMV Promotor, der sich zur eukaryotischen Expression eignet. Da die Leadersequenz bei der Klonierung erhalten, die Transmembrandomäne aber eliminiert wurde, können die Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Durch Fusion mit einem His-Tag können diese Proteine aufgereinigt werden und mit Hilfe von anti-His-Antikörpern detektiert werden.

Diese Expression erwies sich jedoch als unerwartet schwierig. Während sich das kleinere CD83-Fusionsprotein (ca. 30 kDa in glykosyliertem Zustand, unglykosyliert: 19,9 kDa) durch die zu Beginn gewählte Transfektionsmethode - der Lipofektion mit Lipofectamine der Firma Invitrogen - transfizieren und sowohl in COS-7- und 293- als auch in CHO-K1-Zellen exprimieren ließ, war dies bei den Siglecs nicht möglich. Sie wurden in zu geringen Mengen exprimiert und ließen sich auf dem Western Blot nicht detektieren. Auch Optimierungsversuche bezüglich der Aufreinigung und der Detektion führten nicht zum Erfolg. Die Plasmide waren sequenziert worden und die Sequenzen waren korrekt. Ein Agarosegel der Plasmide ergab, dass die Plasmide nicht degradiert waren. Sie konnten in ihrer ursprünglichen Größe auf dem Gel detektiert werden (Abbildung 4.17).

Ergebnisse

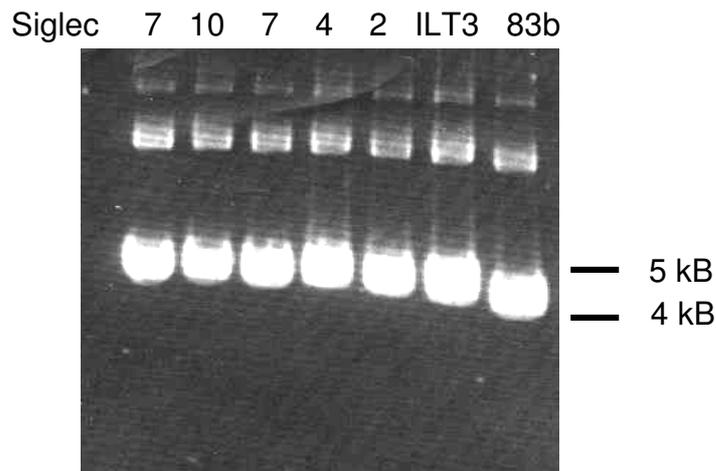


Abbildung 4.17: Agarosegel der Plasmide verschiedener Siglecs, ILT3 und CD83.

Erst nach Umstellung der Transfektion auf die Calciumphosphatpräzipitation gelang es, das erste Siglec, nämlich Siglec-7, zu exprimieren, aus dem Überstand aufzureinigen und auf dem Western Blot zu detektieren (Abbildung 4.18). Die Lektine wurden in den bisherigen Versuchen als Surrogatmarker für Siglec-Liganden verwendet, da die Siglecfusionsproteine nicht zur Verfügung standen. Durch die erfolgreiche Expression von Siglec-7 konnte ein Verfahren etabliert werden, mit dem auch weitere Siglecs exprimiert werden können. Mit diesen rekombinant exprimierten Siglecs steht dann ein wertvolles Werkzeug zur Verfügung, welches sowohl für Färbungen in der durchflusszytometrischen Analyse als auch in funktionellen Assays, z. B. Zytotoxizitätsassays, eingesetzt werden kann.

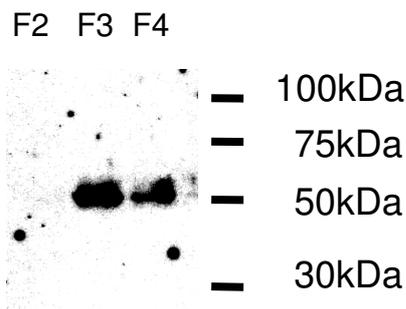


Abbildung 4.18: Western Blot (4-12% Gel). Expression von Siglec-7. Elutionsfraktionen 2, 3 und 4 der Nickel-Affinitätschromatographie werden gezeigt. Detektiert wurde mit anti-His-HRP-Konjugat. Siglec-7 ist in den Fraktionen 3 und 4 zu sehen (Molekulargewicht unglykosyliert 40,8 kDa; hier glykosyliert deshalb Detektion bei ca. 55 kDa).

4.2 CD83

4.2.1 Expression von rekombinantem CD83

CD83 ist aus der Literatur bekannt als Marker für reife DC. Sein Ligand konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Um weitere Erkenntnisse über den Liganden zu erlangen, wurde die externe Domäne des humanen CD83 als Fusionsprotein mit CHO-K1-, COS-7- und 293-Zellen exprimiert. Da CD83 wie die Siglecs ein Glykoprotein ist, wurden eukaryotische Zellen zur Expression gewählt. Wichtige Eigenschaften des Fusionsproteins sind die Biotinylierungszielsequenz und ein His-Tag. Dieses ist sowohl für die Aufreinigung als auch für die Detektion von besonderer Bedeutung

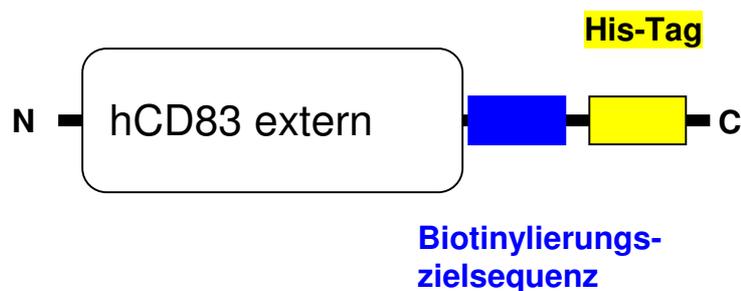


Abbildung 4.19: Schematische Darstellung des CD83-Fusionsproteins und dessen wichtigsten Eigenschaften (CD83^{ext}).

Zur Expression wurde eine Lipofektion oder eine Transfektion mittels der Calciumphosphatpräzipitation durchgeführt. Da das CD83-Fusionsprotein trunkiert wurde und nur noch aus der externen Domäne bestand, wurde es von den Zellen sezerniert und konnte dann aus dem Überstand mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose-Säulen aufgereinigt werden. Dabei wurden 10 Fraktionen aufgefangen. Mittels Western Blot wurden die einzelnen Fraktionen auf Anwesenheit des Proteins hin untersucht (Abbildung 4.20).

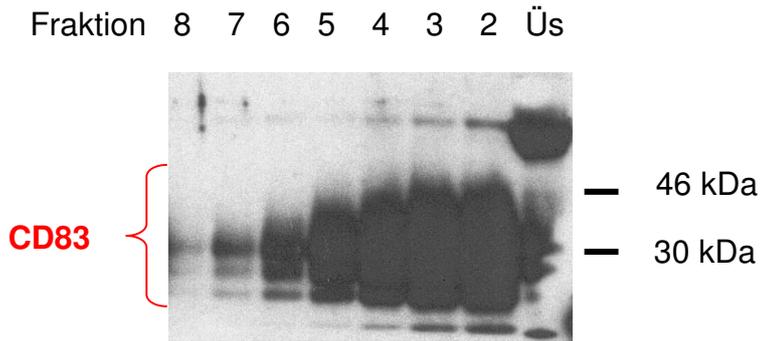


Abbildung 4.20: Western Blot zur Überprüfung der Expression von CD83 und Sekretion in den Überstand. Untersucht wurden die Fraktionen 2-8 und der Überstand (Üs). CD83 zeigt sich als Tripelbande im Western Blot. Hierbei handelt es sich am ehesten um verschiedene Glykosylierungsstufen. Transfektionsmethode: Lipofektion. Detektion mit anti-His-HRP-Konjugat.

Bezüglich der Effizienz erwiesen sich die 293-Zellen als die geeignetsten Zellen für die Proteinexpression, sowohl für die Lipofektion, als auch für die Transfektion durch Calciumphosphatpräzipitation. Die Abbildung 4.21 zeigt den direkten Vergleich zwischen der Expression in 293- und COS-7-Zellen. Die Banden sind in der erwarteten Größenordnung von ca. 30 kDa in den Spuren der Elutionsfraktionen F3-F6 zu detektieren.

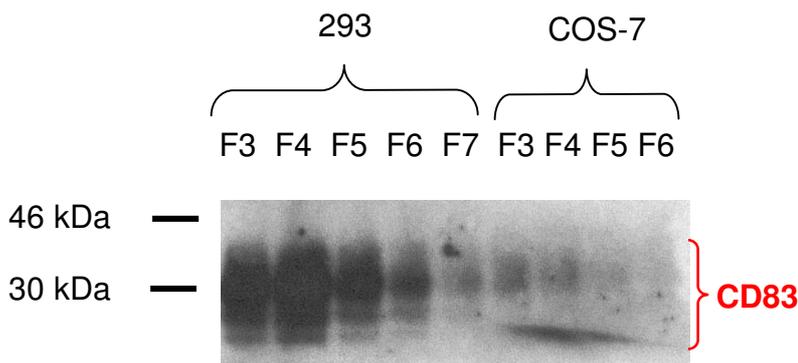


Abbildung 4.21: Western Blot zur Überprüfung der Produktion von CD83^{ext} in 293-Zellen (Fraktionen 3-7) und COS-7-Zellen (Fraktionen 3-6) unter gleichen Bedingungen. Transfektion mit Lipofectamine. Detektiert mit anti-His-HRP-Konjugat.

Um die Identität von CD83 zu bestätigen wurde ein Immunoblot der Elutionsfraktion F3 angefertigt und mit α CD83 detektiert (Abbildung 4.22). Die Banden liefen auf gleicher Höhe wie die Banden, die durch Detektion mit anti-His-HRP-Konjugat erhalten wurden. Es ist hier auch zu erkennen, dass es sich um eine sehr breite Tripelbande handelt. Dies ist typisch für CD83 und wurde auch schon von anderen Gruppen so gezeigt. Bei den Banden handelt es sich am ehesten um verschiedene Glykosylierungsstufen (Cao et al., 2005).

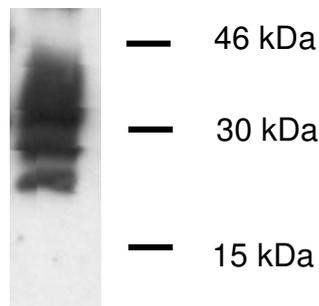


Abbildung 4.22: Western Blot zur Überprüfung der Identität der Tripelbande mit α CD83. Fraktion 3 nach Aufreinigung aus Überstand. Transfiziert durch Lipofektion. Detektiert mit α CD83 und α Mouse-HRP-Konjugat.

Für weitere Versuche wurden größere Mengen an CD83 benötigt, so wurde auf die kostengünstigere und effektive Transfektionsmethode, die Calciumphosphatpräzipitation, umgestellt.

Untersuchte man die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung, so fand sich das CD83 hauptsächlich in den Fraktionen 2-7. Diese Fraktionen wurden gepoolt, eingeengt und in Tris-HCl (10 mM, pH8) aufgepuffert. CD83 konnte dann durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Färbung des Gels nach der Coomassie-Methode nachgewiesen werden. Die Konzentration von CD83 wurde visuell abgeschätzt im Vergleich zu Albuminstandards. Die Menge, die man nach Transfektion von 293-Zellen pro Zellkulturflasche (162 cm², 25 ml Zellkulturüberstand) erhielt, betrug ca. 2-3 μ g.

4.2.2 Biotinylierung von CD83^{ext}-Fusionsprotein

Die Affinitäten zwischen Lektinen und ihren Liganden sind oft sehr gering. So liegt die Affinitätskonstante für eine Lektin-Monosaccharid-Bindung typischerweise im millimolaren Bereich (Lis und Sharon, 1998). Multivalente Bindungen können die Avidität von niedrigaffinen Bindungen verstärken. Um in der durchflusszytometrischen Analyse bessere Signale zu erhalten, wurde eine Methodik angewendet, die aus der MHC-Forschung bekannt ist – die Tetramerisierung. Die Biotinylierungszielsequenz erlaubt hierbei die enzymatische Addition eines Biotins pro CD83-Fusionsprotein. Tetramerische CD83-Komplexe werden in Gegenwart von Streptavidin, welches für Biotin vier Bindungsstellen besitzt, gebildet.

Hierzu wurde das CD83-Fusionsprotein mit Tris-HCl umgepuffert und anschließend an der Biotinylierungszielsequenz durch das Biotinylierungsenzym BIRA biotinyliert (Abbildung 4.23).

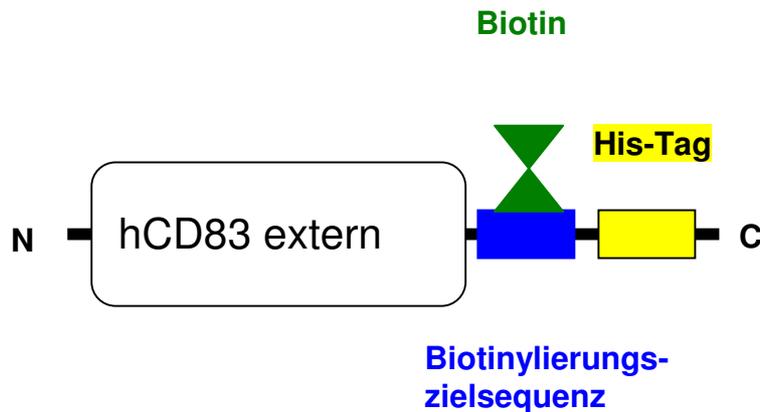


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung des CD83-Fusionsproteins nach der Biotinylierung (CD83^{biot}).

Der Erfolg der Biotinylierung wurde auf dem Western Blot durch Detektion mit SA-HRP überprüft (Abbildung 4.24).

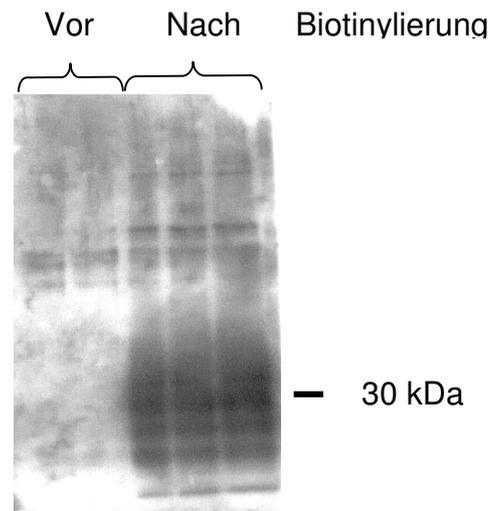


Abbildung 4.24: Western Blot zur Überprüfung der Biotinylierung des CD83-Fusionsproteins. Detektion mit SA-HRP.

4.2.3 Tetramerisierung von biotinyliertem CD83-Fusionsprotein

Nach der erfolgreichen Biotinylierung wurde das CD83-Fusionsprotein mit SA-HRP oligomerisiert. Um idealerweise Tetramere zu erhalten, wurde das SA-HRP im molaren Verhältnis 1:4 in Bezug auf das CD83 eingesetzt.

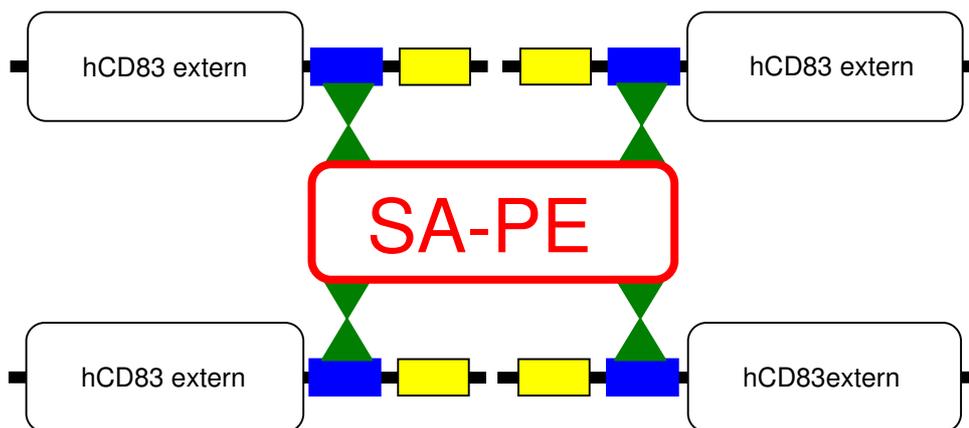


Abbildung 4.25: Schematische Darstellung des tetramerisierten CD83; rot: SA-PE, grün: Biotin, blau: Biotinylierungszielsequenz, gelb: His-Tag, weiß: humanes CD83 extern.

Das tetramerisierte CD83 (CD83^{tet}:SA-PE) konnte dann für Färbungen in der durchflusszytometrischen Analyse eingesetzt werden.

4.2.4 Durchflusszytometrische Analyse von PBMC nach Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE

Von zwei Arbeitsgruppen wurden bisher Ergebnisse bezüglich des CD83-Liganden (CD83L) veröffentlicht. Scholler et al. fanden den CD83L auf Monozyten und aktivierten oder gestressten CD8⁺ T-Zellen (Scholler et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um A. Steinkasserer fand den Liganden auf reifen und unreifen DC (Lechmann et al., 2001). Zur Untersuchung dieser diskrepanten Befunde, die mit unterschiedlichen Methoden erhoben wurden, wurde das CD83^{tet}:SA-PE in der Durchflusszytometrie eingesetzt.

In ersten Versuchen wurden frisch isolierte PBMC mit CD83^{tet}:SA-PE gefärbt. Wurden die PBMC gesamt betrachtet fand man zwischen 0,2% und 2,7% CD83L positive Zellen (Abbildung 4.28). Dieser Wert variierte in Abhängigkeit vom Spender als auch vom Versuchstag. Humanes Albumin im Färbeansatz hob die Bindungsfähigkeit von CD83 nicht auf. Betrachtete man die Lymphozyten näher, fand man zwischen 0,2% und 0,8% positive Zellen (Abbildung 4.26). Diese Werte waren zwar sehr gering, lagen aber immer über denen der Negativkontrollen mit SA-PE. Die Zellen ließen sich durch Gegenfärbungen (z. B. mit α CD4, α CD8, α CD14, α CD19, α CD56 und α CD83) keiner bestimmten Zellpopulation zuordnen (ohne Abbildung).

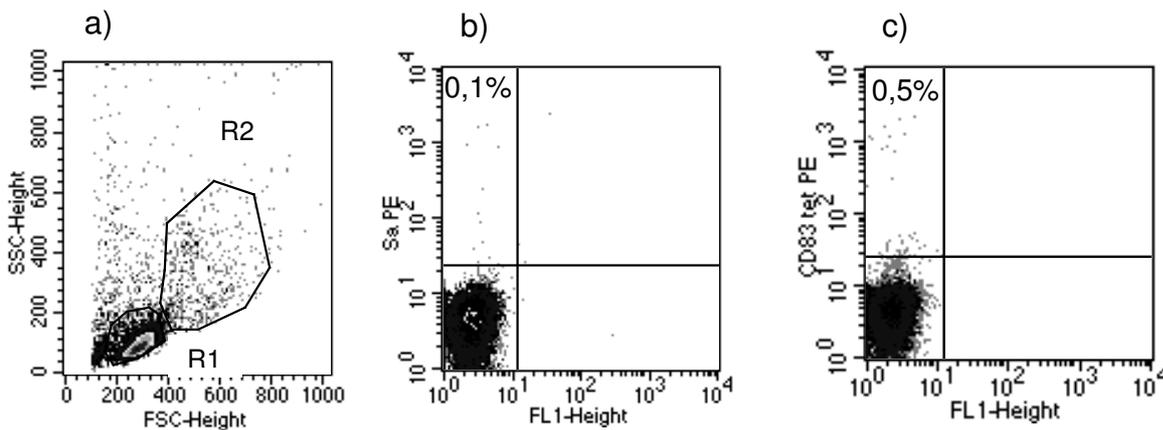


Abbildung 4.26: Durchflusszytometrische Analyse von PBMCs, elektronisch gated auf Lymphozyten und Monozyten; a) Light-Scatter-Bild der PBMC mit den Gates R1 (Lymphozyten) und R2 (Monozyten), b) Negativkontrolle der Lymphozyten mit SA-PE; c) Lymphozyten gefärbt mit CD83^{tet}:SA-PE. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Zellen im jeweiligen Gate.

Auf Monozyten konnte durch die durchflusszytometrische Analyse der CD83L nicht nachgewiesen werden. Da Monozyten bekanntermaßen leicht unspezifisch Proteine binden, zeigte sich in der durchflusszytometrischen Analyse eine stärkere Bindung von CD83^{tet}:SA-PE an Monozyten als an Lymphozyten. Betrachtet man jedoch das Histogramm, so wird klar, dass die Bindung nicht über die der Negativkontrolle hinausgeht (Abbildung 4.27).

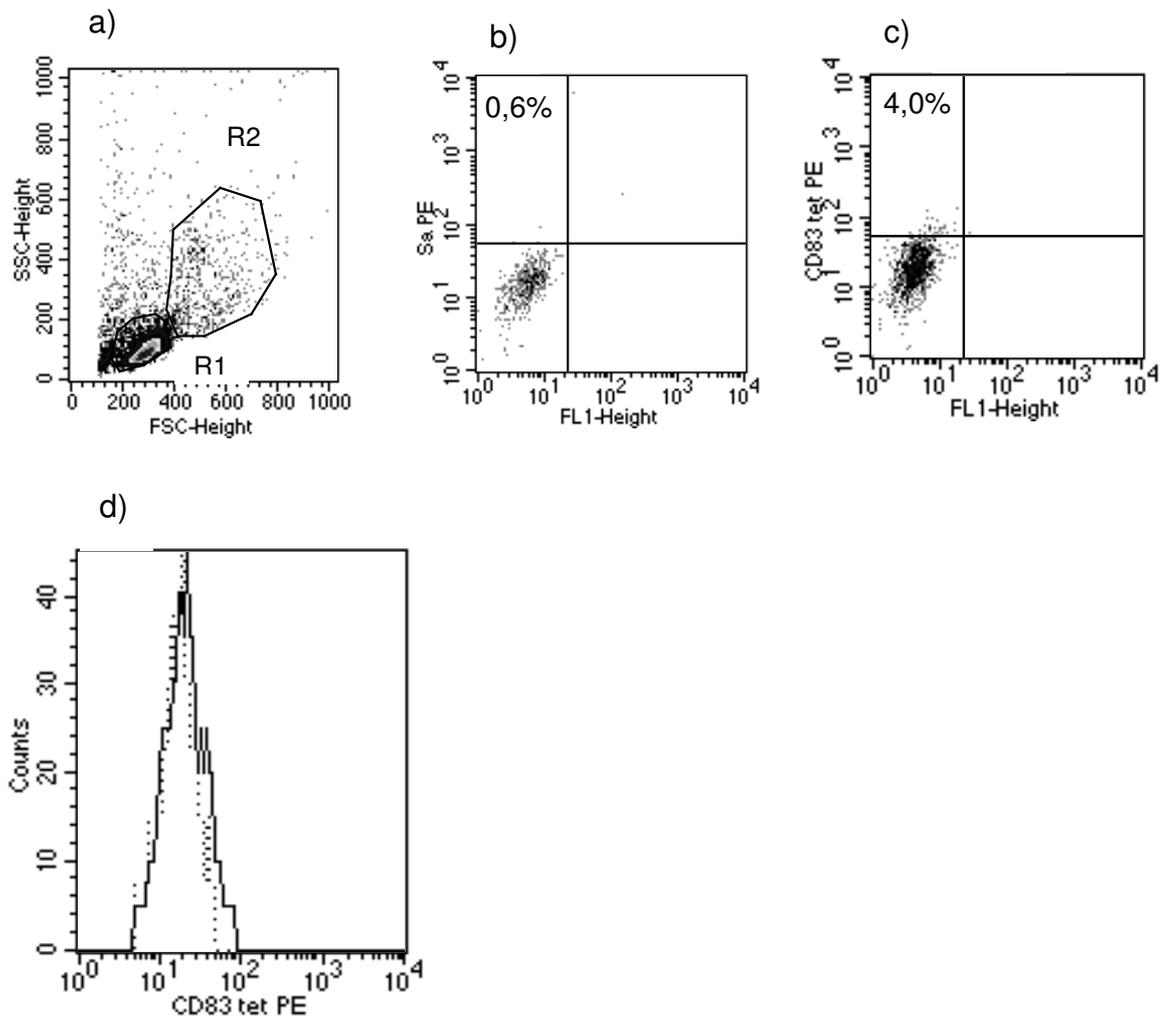


Abbildung 4.27: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC, elektronisch gated auf Lymphozyten und Monozyten. a) Light-Scatter-Bild der PBMC mit den Gates R1 (Lymphozyten) und R2 (Monozyten); b) Negativkontrolle der Monozyten mit SA-PE; c) Monozyten gefärbt mit CD83^{tet}:SA-PE. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Zellen im jeweiligen Gate; d) Histogramm: CD83L auf Monozyten, Negativkontrolle SA-PE (gepunktete Linie) im Vergleich zu CD83^{tet}:SA-PE (durchgezogene Linie).

Im peripheren venösen Blut zirkuliert eine kleine Population von DC. Diese ist durch die Abwesenheit von CD3, CD19, CD56 und CD14 charakterisiert. Wie in Abbildung 4.28 gezeigt, präsentierte sich diese Population in der durchflusszytometrischen Analyse nicht CD83L positiv.

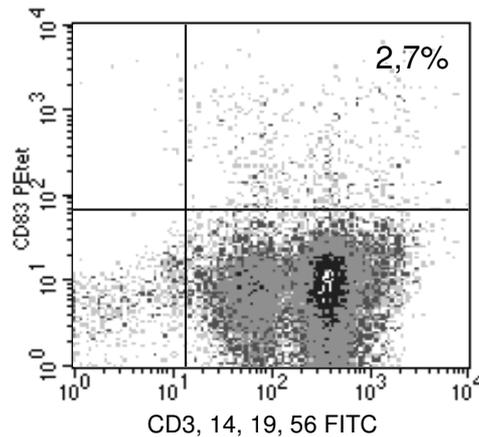


Abbildung 4.28: Dargestellt sind die PBMC gesamt. Gefärbt wurde mit CD83^{tet}:SA-PE, gegengefärbt wurde mit einem Antikörpercocktail bestehend aus CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC und CD56-FITC. Die im Blut zirkulierenden DC (CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ CD56⁻) innerhalb der PBMC präsentierten sich CD83^{tet}:SA-PE-negativ (linker unterer Quadrant). Insgesamt sind 2,7% der PBMC CD83L positiv.

4.2.5 Durchflusszytometrische Analysen von Monozyten-abgeleiteten DC mit CD83^{tet}:SA-PE

In weiteren Experimenten wurden DC untersucht, die durch Stimulation mit IL-4 und GM-CSF aus Monozyten generiert worden waren. Die Abbildung 4.29 zeigt die Ergebnisse der unreifen DC und der durch einen Zytokincocktail, bestehend aus IL-6, IL-1 β , TNF- α und PGE₂, gereiften DC. Nur wenige Zellen innerhalb dieser Populationen waren CD83L positiv. Da es sich bei diesem Experiment um eine einheitliche Population handelt, wäre erwartet worden, dass sich mehr Zellen CD83L positiv präsentieren als im in Abbildung 4.29 dargestellten Experiment. Die Zellvitalität wurde mit Propidiumiodid (PI) ermittelt, wobei sich spätapoptotische oder tote Zellen detektieren lassen, deren Plasmamembran nicht mehr intakt ist. Ca. 20% der Zellen präsentierten sich PI positiv (ohne Abbildung).

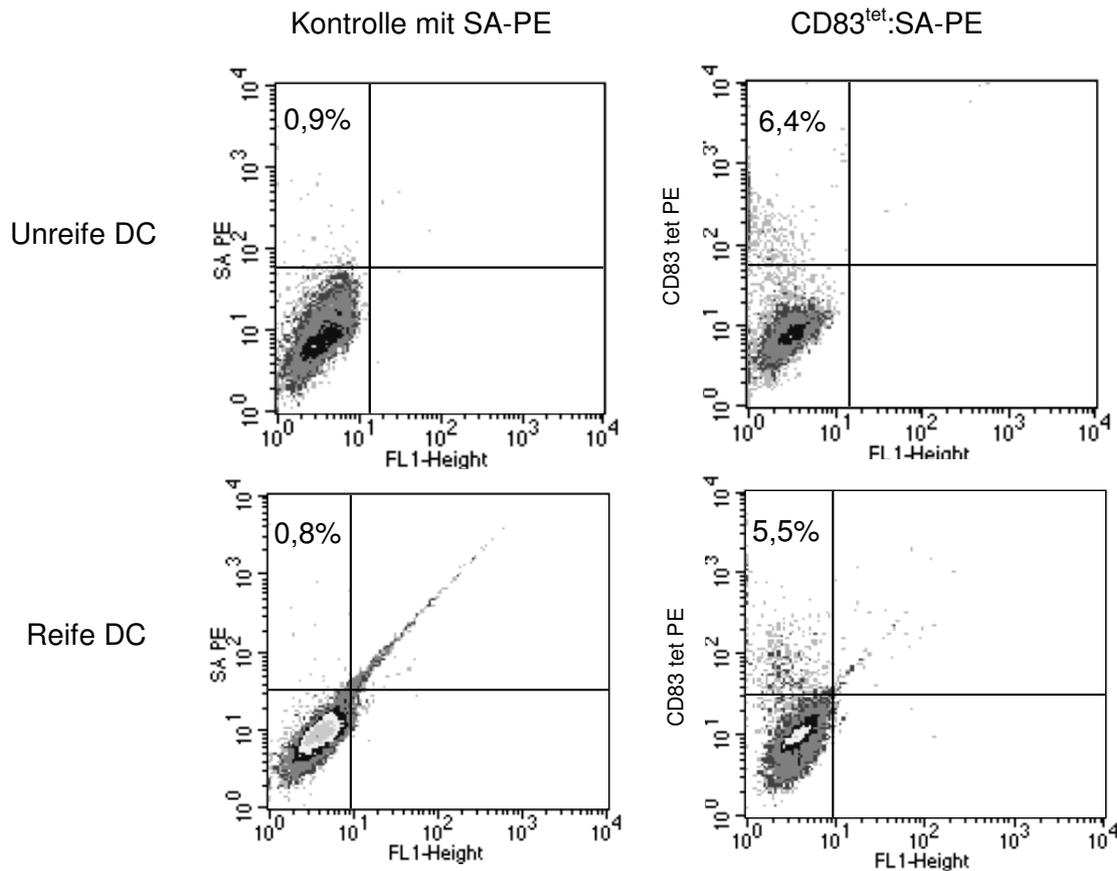


Abbildung 4.29: Durchflusszytometrische Analyse reifer und unreifer DC. Gefärbt wurde mit CD83^{tet}:SA-PE, die Negativkontrolle wurde mit SA-PE gefärbt.

4.2.6 Durchflusszytometrische Analyse von CD83L-Expression auf MNC aus Lymphknoten

Lymphknoten sind wichtige Bestandteile des Immunsystems. In Bezug auf CD83 ist interessant, dass reife aktivierte DC, die ja CD83 auf ihrer Oberfläche exprimieren, zu den Lymphknoten wandern. Deshalb war es von besonderem Interesse, humane Lymphknoten zu untersuchen. Hierbei ergab sich bezüglich des CD83L ein unerwartetes Ergebnis. Innerhalb der Lymphozyten befanden sich Zellpopulationen die deutlich CD83^{tet}:SA-PE positiv waren. Bei näherer Betrachtung zeigte sich, dass die CD83^{tet}:SA-PE positiven Zellen tot waren. Jedoch waren nicht alle PI positiven Zellen auch CD83-Ligand positiv (Abbildung 4.30). CD83L ließ sich sowohl auf CD4⁺ und CD4⁻ als auch auf CD8⁺ und CD8⁻ Lymphozyten nachweisen (Abbildung 4.32). Gegenfärbung mit α CD45 zeigte, dass alle CD83 positive Zellen zu den Leukozyten

zählten (Abbildung 4.31). CD45 wird von allen Leukozyten exprimiert, nicht aber von nicht-hämatopoietischen Zellen (Knapp et al., 1989).

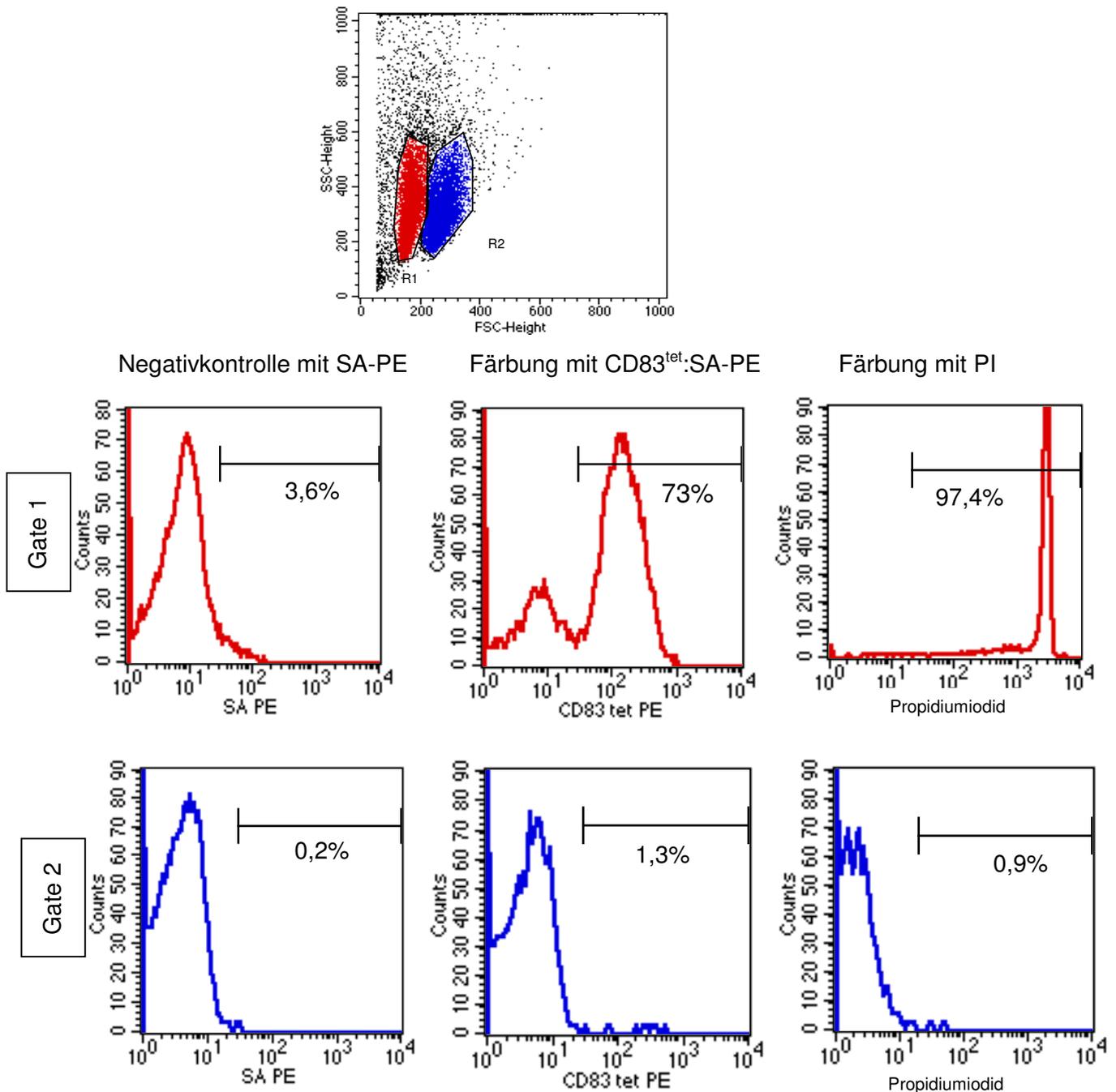


Abbildung 4.30: Durchflusszytometrische Analyse der CD83L-Expression auf MNC aus Lymphknoten. In der oberen Reihe ist Gate1 (rot) dargestellt, in der unteren Reihe Gate 2 (blau). Während in Gate 1 97,4% der Zellen PI positiv und 73% der Zellen CD83^{tet}:SA-PE positiv sind, sind in Gate 2 im Vergleich dazu nur 0,9% PI positiv und somit auch weniger Zellen CD83^{tet}:SA-PE positiv, nämlich nur 1,3%.

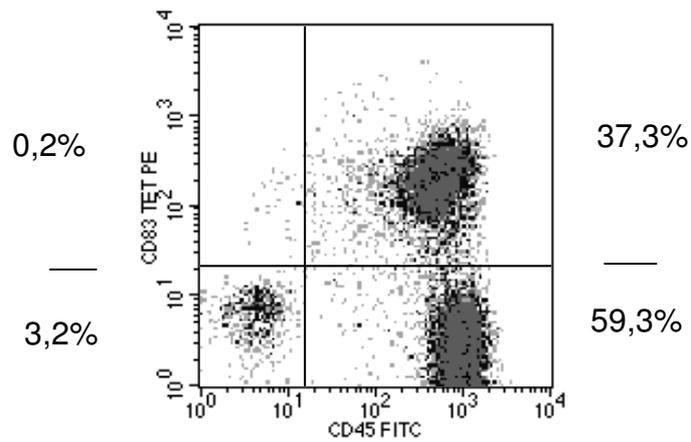


Abbildung 4.31: CD83L-Expression auf MNC aus Lymphknoten, gegengefärbt mit α CD45-FITC. CD83L positive Zellen gehören zu den Leukozyten.

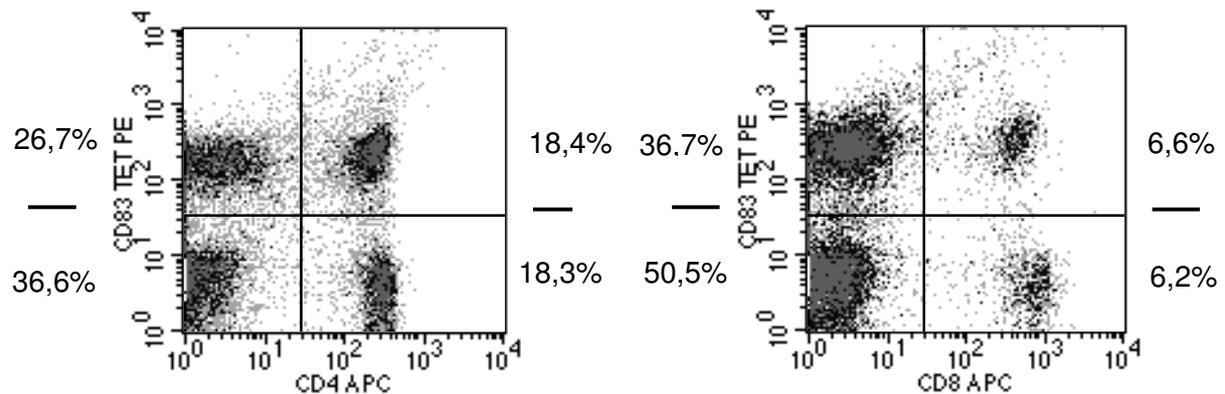


Abbildung 4.32: CD83L-Expression auf MNC aus Lymphknoten, gegengefärbt mit α CD4-APC (links) und α CD8-APC (rechts).

Wurde der Lymphknoten sofort nach der Entnahme in Formalinlösung fixiert, fand man bei der durchflusszytometrischen Analyse im Light-Scatter nur eine Population. Auch diese enthielt CD83L positive Zellen. Färbungen mit PI ergaben, dass die Membran dieser Zellen permeabilisiert worden war (Abbildung 4.33).

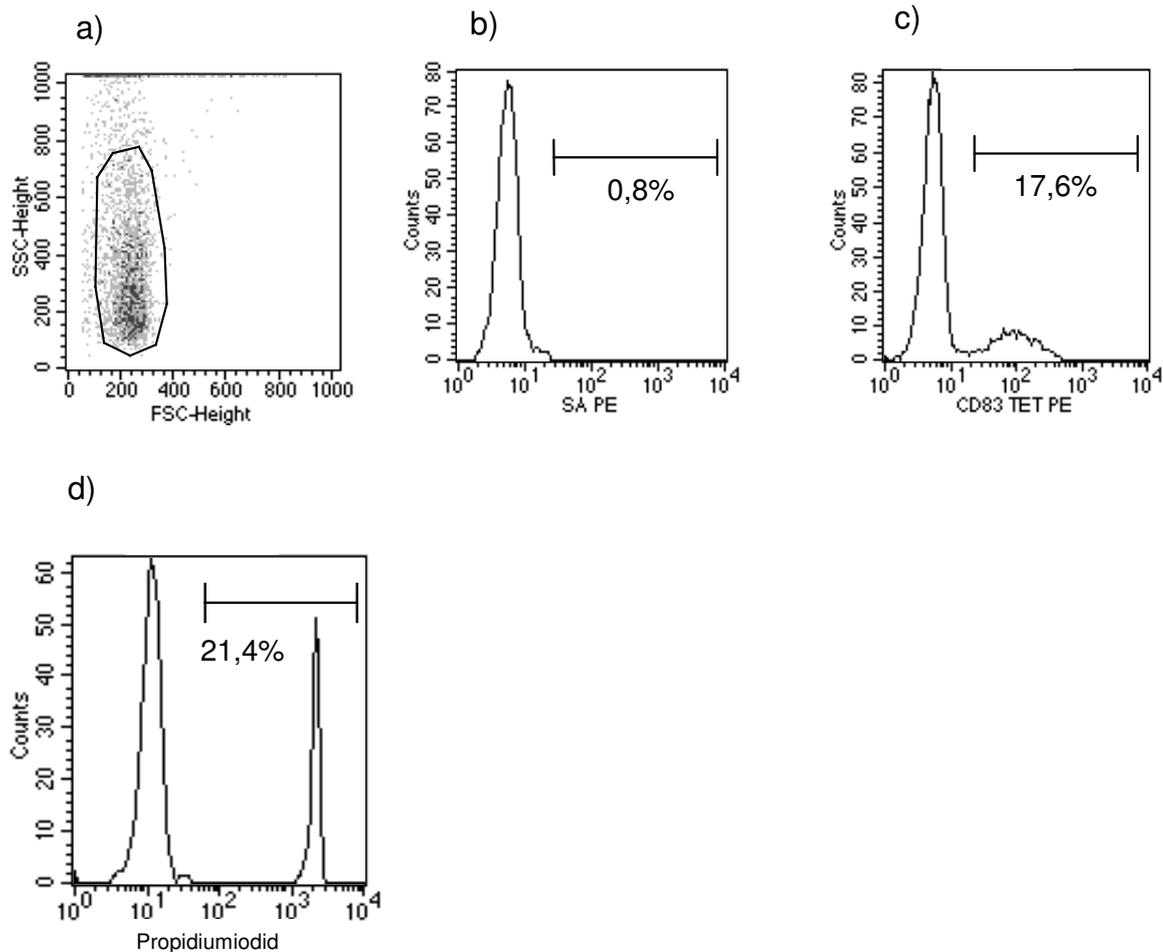


Abbildung 4.33: CD83L-Expression auf Formalin-fixierten Lymphozyten aus humanem Lymphknoten; a) Light-Scatter-Bild; b) Negativkontrolle mit SA-PE; c) Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE; d) Färbung mit PI.

4.2.7 Durchflusszytometrische Analyse von CD83L-Expression auf MNC des Thymus

Aus knock-out Studien ist bekannt, dass CD83 im Thymus eine wichtige Rolle für die Entwicklung der CD4⁺ Lymphozyten spielt (Fujimoto et al., 2002). Deshalb wurden Thymozyten auf CD83L-Expression untersucht. Wie beim Lymphknoten, konnte der CD83-Ligand auf apoptotischen bzw. toten Zellen nachgewiesen werden. Jedoch waren auch hier nicht alle PI positiven Zellen auch CD83-Ligand positiv (Abbildung 4.36). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich manche Zellen im Light-Scatter durch das CD83 im Vergleich zur Negativkontrolle veränderten (Abbildung

4.35). Eine Veränderung des Zytoskeletts durch hohe Konzentrationen an CD83 wurde vor kurzem auch in der Literatur beschrieben (Kotzor et al., 2004).

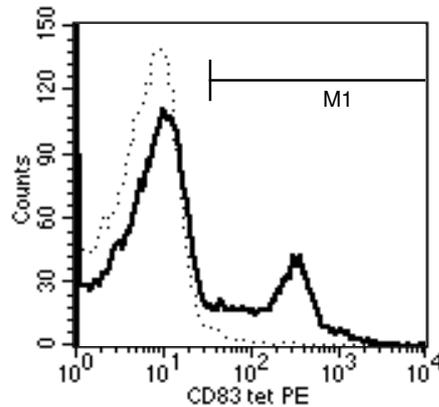


Abbildung 4.34: CD83L auf humanen Thymozyten; gepunktete Linie: Negativkontrolle mit SA-PE (M1: 2%); durchgezogene Linie: Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE (M1: 22%). Dargestellt ist die Gesamtpopulation ohne Gate.

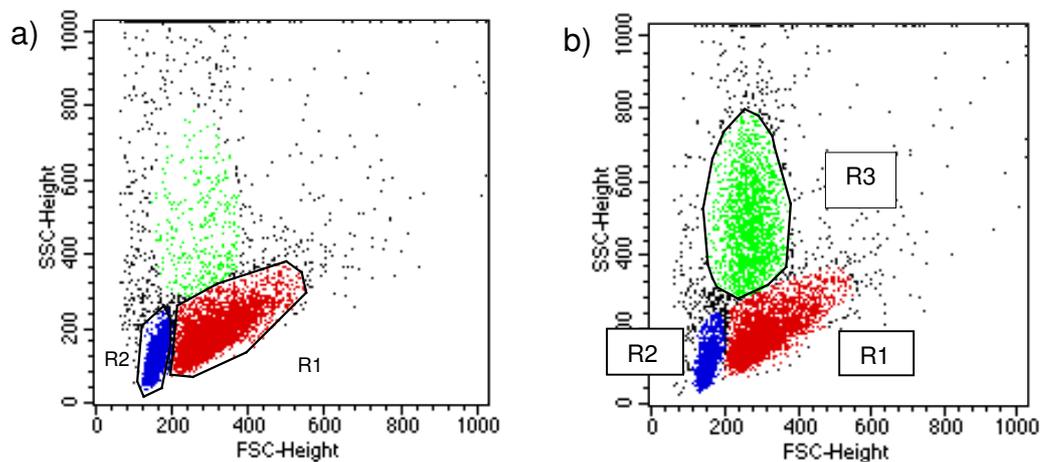


Abbildung 4.35: Veränderung des Light-Scatter-Bildes von Thymozyten durch Zugabe von CD83^{tet}:SA-PE; a) Negativkontrolle mit SA-PE; b) Ansatz mit CD83^{tet}:SA-PE, die Veränderung ist besonders in R3 (grün markiert) zu beobachten.

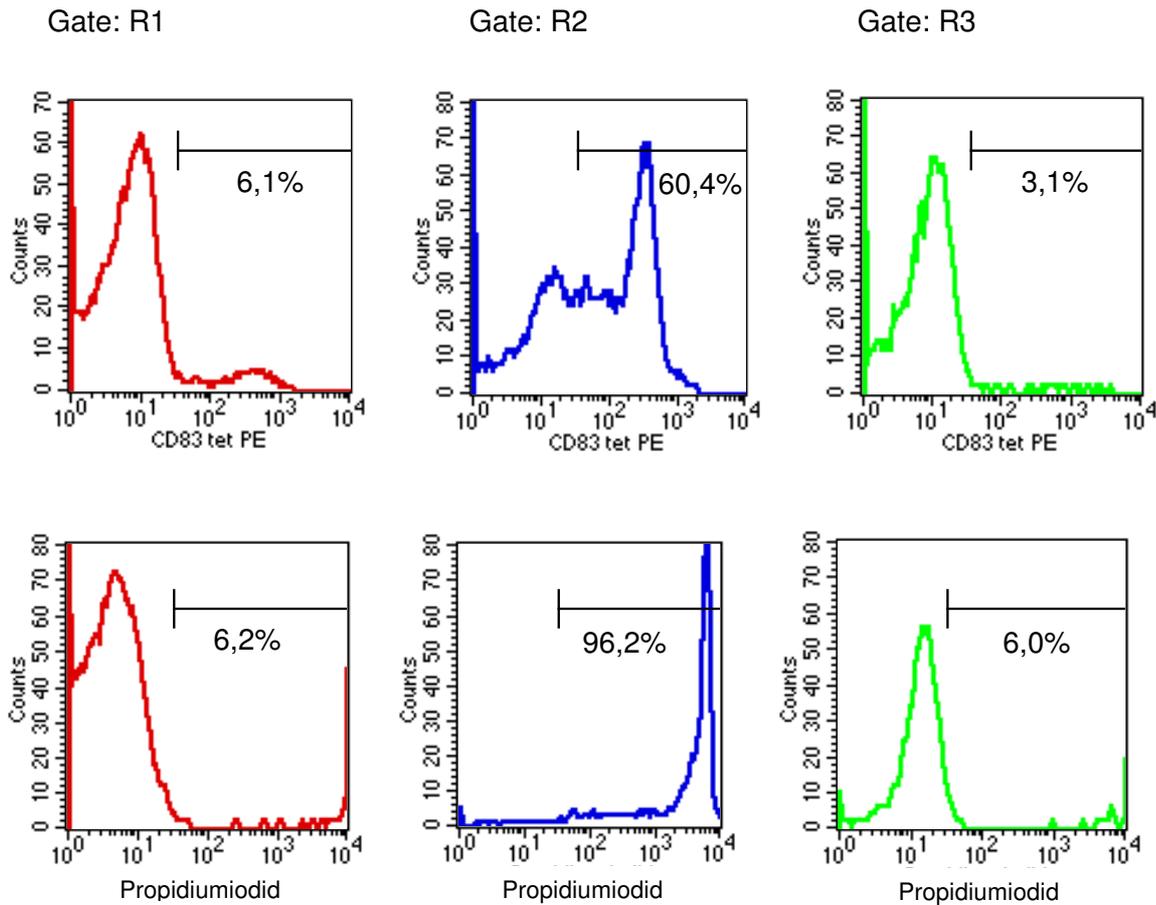


Abbildung 4.36: CD83L-Positivität der Thymozyten in den einzelnen Gates (obere Reihe). In der unteren Reihe befinden sich die dazugehörigen Färbungen mit PI. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die Zellen im Gate.

Bei der Untersuchung mehrerer Thymusproben zeigte sich, dass der Anteil der CD83L positiven Zellen stark variierte. Dies war zurückzuführen auf die unterschiedliche Probenqualität, insbesondere die Lagerungsdauer.

Bei der Färbung von apoptotischen bzw. toten Zellen besteht immer die Möglichkeit, dass es zu unspezifischen Bindungen kommt. Ein wichtiges Indiz, dass es sich bei den hier dargestellten Ergebnissen um eine spezifische Bindung handelt, stellt die Tatsache dar, dass nicht alle PI positiven Zellen CD83^{tet}:SA-PE-positiv sind (Abbildung 4.36, Gate 2: 96,2% der Zellen waren PI positiv, im Vergleich dazu waren nur 60,4% der Zellen CD83^{tet}:Sa-PE positiv). Die Bindung von CD83^{tet}:SA-PE ließ sich durch Präinkubation mit humanem Polyglobin und durch Polyglobin im

Färbeansatz nicht antagonisieren (Abbildung 4.37). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass es sich in diesem Fall um eine spezifische Bindung handelt.

Wurde Gewebe aus der Nähe des Thymus (makroskopisch am ehesten Muskelzellen) analysiert, welches exakt gleich aufbereitet und gefärbt wurde, fand man keine $CD83^{tet}$:SA-PE-Positivität, die über die Negativkontrolle mit SA-PE hinausging (Abbildung 4.38). Dass es sich nicht um Thymuszellen handelte wurde durch Färbungen mit $\alpha CD4$ und $\alpha CD8$, welche negativ waren (ohne Abbildung), nachgewiesen.

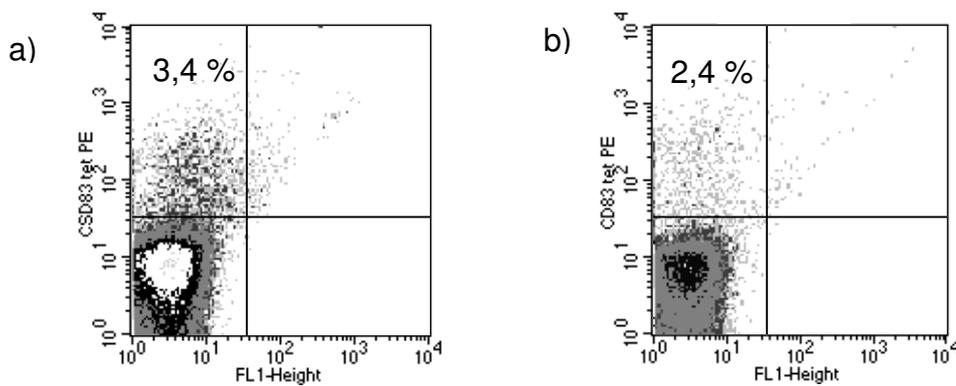


Abbildung 4.37: $CD83^{tet}$:SA-PE-Bindung lässt sich durch Polyglobin nicht antagonisieren; MNC aus Thymus gefärbt mit $CD83^{tet}$:SA-PE; a) Ansatz mit Polyglobin; b) ohne Polyglobin.

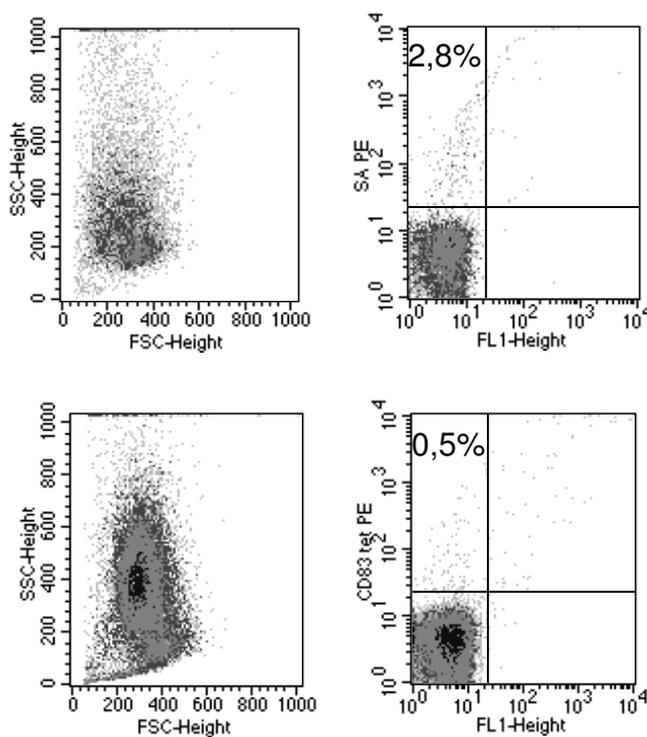


Abbildung 4.38: Zellen aus der Nähe des Thymus (makroskopisch am ehesten Muskelzellen) binden nicht an $CD83^{tet}$:SA-PE. Obere Reihe: Negativkontrolle mit SA-PE; untere Reihe: Färbung mit $CD83^{tet}$:SA-PE.

Ergebnisse

Da es im Thymus unterschiedliche Zellpopulationen gibt, stellte sich die Frage, ob sie sich in der CD83^{tet}:SA-PE-Bindung unterscheiden. Durch Gegenfärbungen mit α CD45 zeigte sich, dass die CD83^{tet}:SA-PE positiven Zellen zugleich auch CD45 positiv waren. Die CD83L positiven Zellen sind im Thymus unter den CD8⁺ und CD8⁻ sowie unter CD4⁺ und CD4⁻ Zellen zu finden.

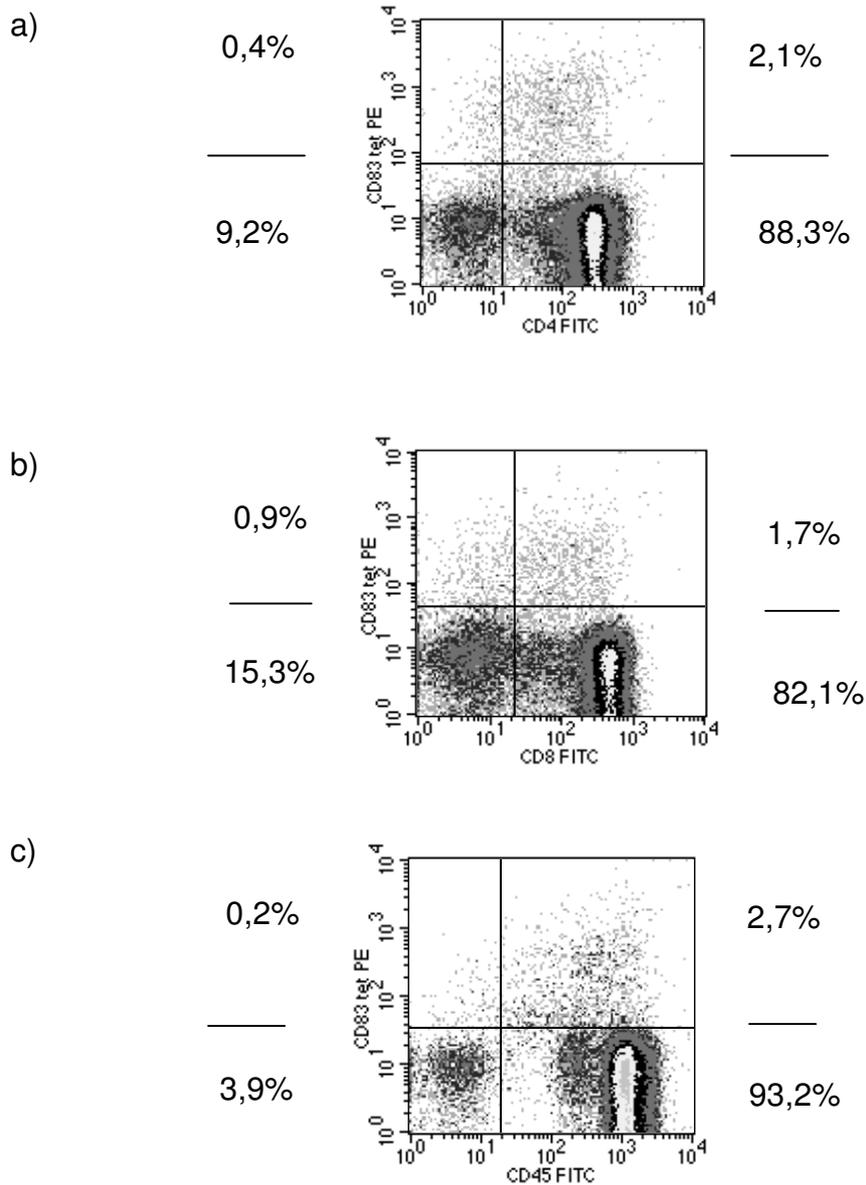


Abbildung 4.39: FACS-Färbung von humanen Thymozyten mit CD83^{tet}:SA-PE, gegengefärbt mit: a) α CD4-FITC, b) α CD8-FITC, c) α CD45-FITC.

Da im Lymphknoten und im Thymus der CD83L auf apoptotischen bzw. toten Zellen zu finden war, stellte sich die Frage, wie sich das Färbeverhalten der Thymozyten gegenüber CD83^{tet}:SA-PE nach Apoptoseinduktion ändert.

Um dies zu untersuchen, wurden Thymozyten über Nacht mit Dexamethason behandelt, eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Dexamethason induziert vor allem in CD4⁺CD8⁺ Thymozyten Apoptose. Einzelpositive Thymozyten sind resistent (van den Brandt et al., 2004). Die Messung der Apoptose erfolgte durch Anfärbung von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC. Wie erwartet nahm die Apoptoserate in der mit Dexamethason behandelten Gruppe zu (Abbildung 4.40). Parallel dazu präsentierten sich in der durchflusszytometrischen Analyse mehr Zellen CD83L positiv (Abbildung 4.41). Abbildung 4.42 zeigt den Zusammenhang zwischen CD83L-Positivität und Annexin V-FITC-Positivität. Gegenfärbungen mit α CD4 und α CD8 verdeutlichten, dass durch die Apoptoseinduktion mit Dexamethason die doppelpositiven Zellen betroffen sind. Gleichzeitig waren in dieser Population auch mehr Zellen CD83L positiv (Abbildung 4.43).

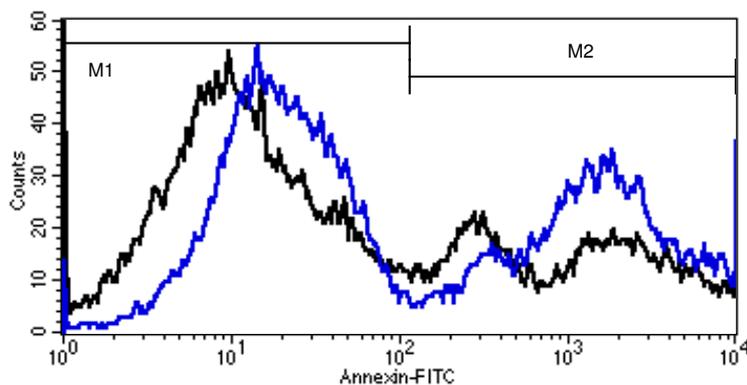


Abbildung 4.40: Apoptoseinduktion durch Dexamethason für 16h in humanem Thymus. Schwarze Linie: Thymozyten unbehandelt, 35% apoptotische Zellen (M2); blaue Linie: Thymozyten mit 1 μ M Dexamethason inkubiert, 44 % apoptotische Zellen (M2); Apoptose wurde mit Annexin V-FITC detektiert.

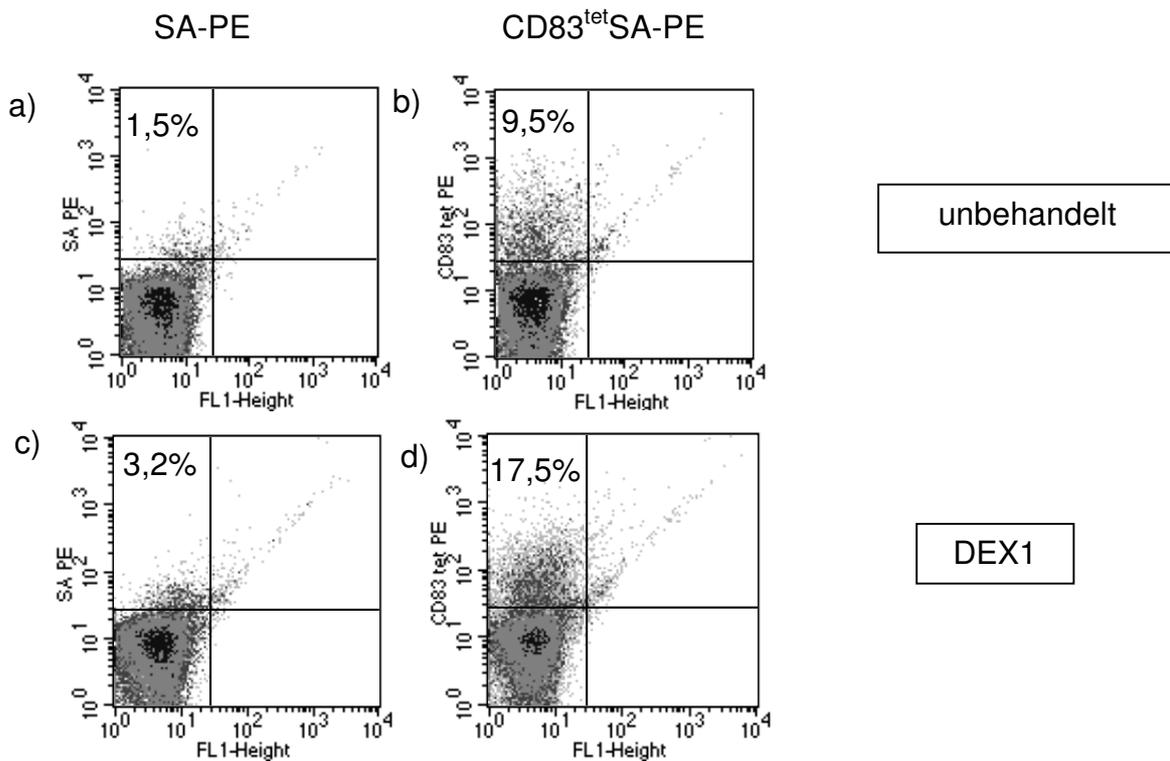


Abbildung 4.41: Veränderung der CD83^{tet}:SA-PE Färbung von Thymozyten durch Apoptoseinduktion: a) unbehandelt, Kontrolle mit SA-PE, b) unbehandelt, gefärbt mit CD83^{tet}:SA-PE, c) DEX1 (1μM Dexamethason), Kontrolle mit SA-PE, d) DEX1, gefärbt mit CD83^{tet}:SA-PE.

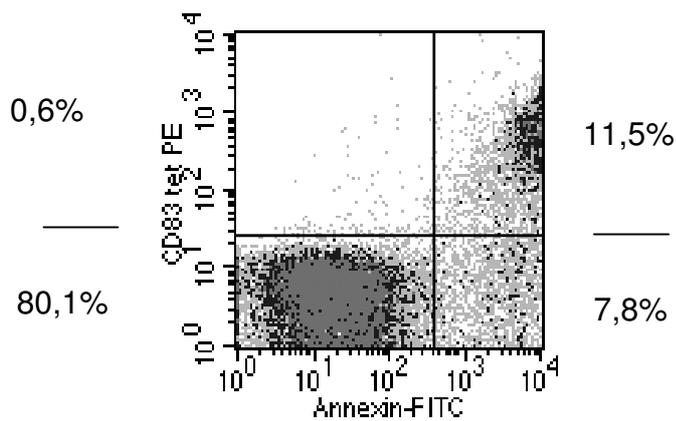


Abbildung 4.42: Thymuszellen nach Apoptoseinduktion mit Dexamethason 2,5 μM für 4 h. CD83L positive Zellen sind Annexin V-FITC positiv.

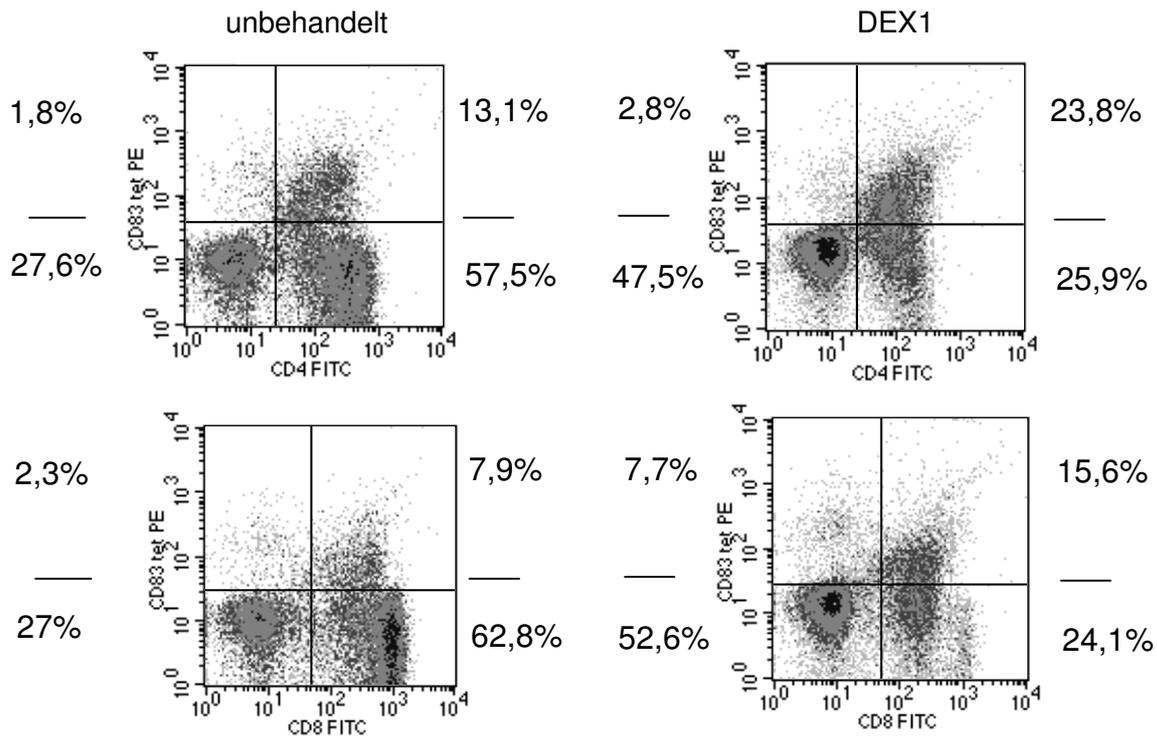


Abbildung 4.43: Durchflusszytometrische Analyse von Thymozyten nach Apoptoseinduktion durch Dexamethason 1 μ M (DEX1). Gefärbt wurde mit CD83^{tet}:SA-PE, gegengefärbt wurde mit CD4-FITC (obere Reihe) und CD8-FITC (untere Reihe).

4.2.8 CD83L wird nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin auf der T-Zelllinie CEM exprimiert

Die bisherigen Experimente zeigten, dass der CD83L sowohl in humanem Lymphknoten als auch im Thymus auf apoptotischen bzw. toten Zellen nachweisbar ist. In weiteren Versuchen wurde mit Hilfe von Zelllinien der direkte Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion und CD83L-Expression aufgezeigt. Für einige T-Zelllinien, u. a. für Jurkats, wurde bereits beschrieben, dass sie in gestresstem Zustand, z. B. nach Inkubation bei pH 6,5, oder apoptotischen Zustand den CD83L auf ihrer Oberfläche tragen (Scholler et al., 2001). Für die weiteren Versuche wurde die T-Zelllinie CEM gewählt, mit der bereits in früheren Projekten des Labors Apoptosemechanismen untersucht worden waren (Müller et al., 2003). Die Zelllinie Jurkat erwies sich in der durchflusszytometrischen Analyse als weniger geeignet, da sie im apoptotischen Zustand eine hohe Eigenfluoreszenz aufwies. Bei der Färbung zeigte die CEM-Zelllinie einige Besonderheiten. Während bei PBMC, Lymphknoten und Thymus 10 Minuten Färbezeit bei Raumtemperatur in Hanks ideal waren,

erwiesen sich für CEM-Zellen häufig längere Färbezeiten, oder auch die Färbung auf Eis als geeigneter. Da für jeden Versuch die optimale Färbebedingung bestimmt wurde, variierten die Bedingungen und werden deshalb bei den Versuchen jeweils mitangegeben. Interessanterweise zeigten die Zelllinien manchmal sehr deutliche morphologische Veränderungen bei der Färbung mit CD83-Fusionsprotein. Insbesondere veränderten sich Zellgröße und Granularität, was im Light-Scatter beobachtet werden konnte. Eine Ursache konnte nicht gefunden werden. Eine Veränderung des Zytoskeletts durch hohe Konzentrationen an CD83 wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet (Kotzor et al., 2004).

Im folgenden Versuch wurde bei CEM-Zellen für 3 h Apoptose mit Staurosporin induziert. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Während der Staurosporin-induzierten Apoptose wird die Membranpermeabilität der äußeren mitochondrialen Membran erhöht. Dadurch wird u. a. Cytochrom c freigesetzt, das Caspasen aktivieren kann (Sordet et al., 2004). 32,5% der CEM-Zellen präsentierten sich nach Apoptoseinduktion CD83^{tet}:SA-PE positiv (Abbildung 4.44). Überprüfte man die Apoptoseinduktion mit Annexin V-FITC, fand man 41% apoptotische Zellen (Abbildung 4.45).

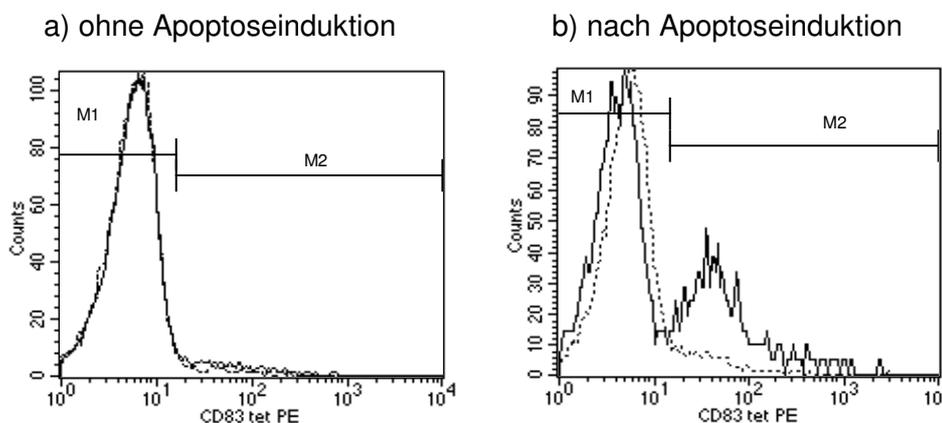


Abbildung 4.44: CD83L wurde nach 3 h Apoptoseinduktion mit Staurosporin (5 μ M) auf 32,5% der Zellen exprimiert: a) Kontrolle unbehandelt (ohne Apoptoseinduktion), Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE (durchgezogene Linie, M2 entspricht 5,6% der Zellen), Negativkontrolle mit SA-PE (gepunktete Linie, M2 entspricht 5,5% der Zellen), b) nach Apoptoseinduktion: Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE (durchgezogene Linie, M2 entspricht 32,5% der Zellen), Negativkontrolle mit SA-PE (gepunktete Linie, M2 entspricht 8,3% der Zellen). Färbebedingung 1 – siehe Abschnitt 3.10.4.

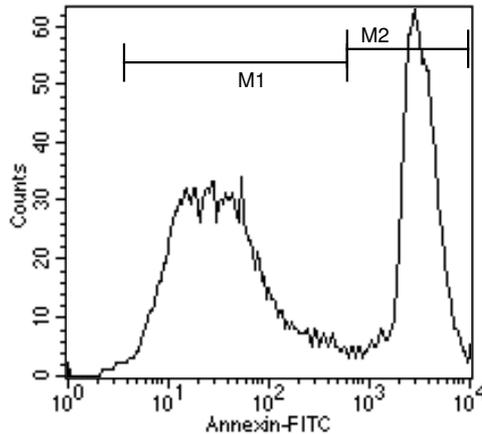


Abbildung 4.45: Überprüfung der Apoptoseinduktion mit Annexin V-FITC. Es waren 59% der Zellen nicht apoptotisch (M1); 41% präsentierten sich apoptotisch, Färbebedingung 1 – siehe Abschnitt 3.10.4.

4.2.9 Einfluss von Tunicamycin auf die CD83L-Expression bei CEM-Zellen

Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen CD83 und der Siglec-Familie wurde bereits früh angenommen, dass der Ligand ein glykosyliertes Molekül ist. Scholler et al. konnten nachweisen, dass CD83 nach Neuraminidasebehandlung nicht mehr an seinen Liganden gebunden hat (Scholler et al., 2001). Um die Art der Glykosylierung näher zu definieren, wurden die CEM-Zellen in folgenden Versuchen mit Tunicamycin behandelt. Tunicamycin stellt einen *N*-Glykosylierungshemmer dar. Es hemmt die GlcNAc-1-P-Transferase. Dadurch wird die Übertragung des ersten Zuckerrestes auf das Dolicholphosphat inhibiert und der *N*-Glykosylierungsweg komplett gehemmt (Elbein, 1991).

Wurden die CEM-Zellen 5 Tage lang mit Tunicamycin behandelt und anschließend durch einen 2-stündigen Hitzeschock bei 42°C gestresst, konnte man deutlich sehen, dass die Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE nicht höher lag als die Kontrolle mit SA-PE. Wurden die Zellen nicht mit Tunicamycin behandelt, färbten die CEM-Zellen mit CD83^{tet}:SA-PE stärker als mit der Kontrolle. Damit wurde gezeigt, dass die Biosynthese des CD83L eine intakte *N*-Glykosylierung voraussetzt.

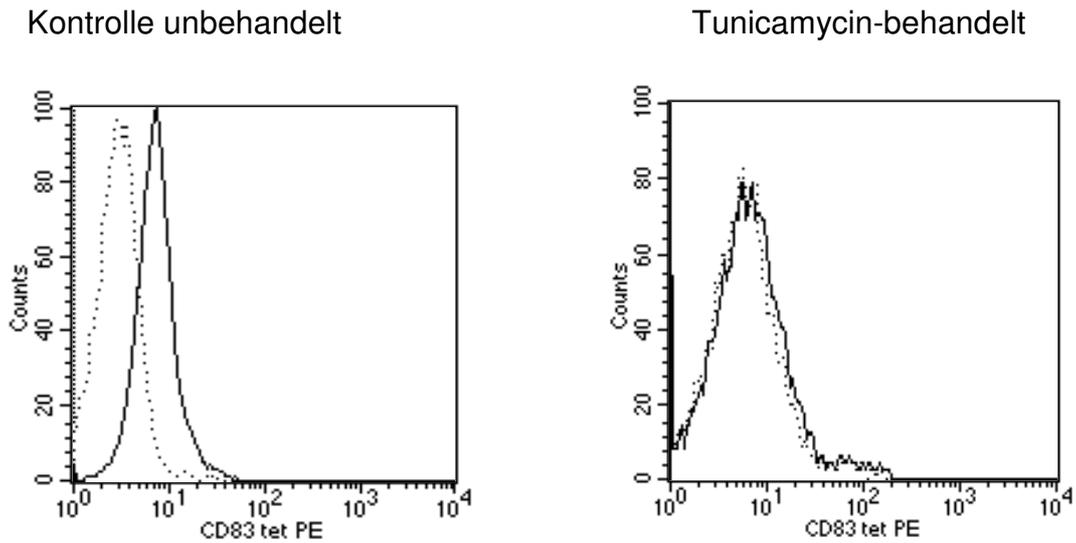


Abbildung 4.46: Einfluss von Tunicamycin auf die CD83L-Expression nach Hitzeschock. Links ist die unbehandelte Kontrolle dargestellt, CD83^{tet}:SA-PE (durchgezogene Linie) färbt stärker als die Kontrolle mit SA-PE (gepunktete Linie). Rechts sind die Tunicamycin-behandelten Zellen (2 Tage 10 µg/ml, anschließend weitere 3 Tage 30 µg/ml) dargestellt, die Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE (durchgezogene Linie) liegt nicht höher als die Kontrollfärbung mit SA-PE (gepunktete Linie). Färbebedingung 2 – siehe Abschnitt 3.10.4.

Interessant ist bei diesem Versuchsaufbau auch das Light-Scatter-Bild. Während sich die nicht mit Tunicamycin behandelten Zellen im Light-Scatter durch Färbung mit CD83 stark veränderten (Abbildung 4.47), erfuhren die mit Tunicamycin behandelten Zellen diese Veränderung nicht (Abbildung 4.48).

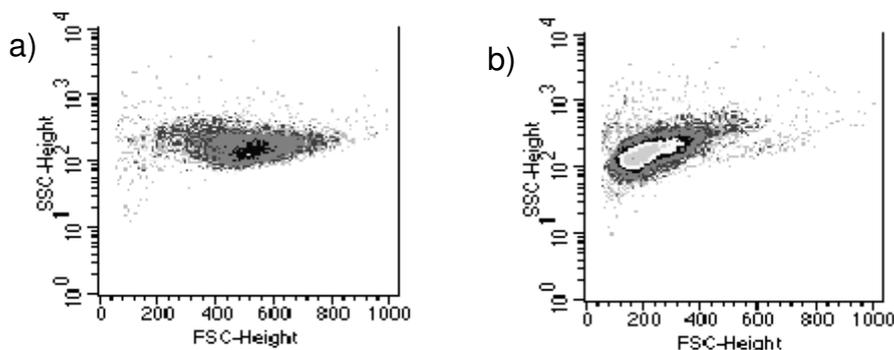


Abbildung 4.47: Veränderungen der Morphologie im Light-Scatter nach 2-stündigem Hitzeschock (ohne Tunicamycin-Vorbehandlung): a) Kontrolle mit SA-PE, b) Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE; Färbebedingung 2 – siehe Abschnitt 3.10.4

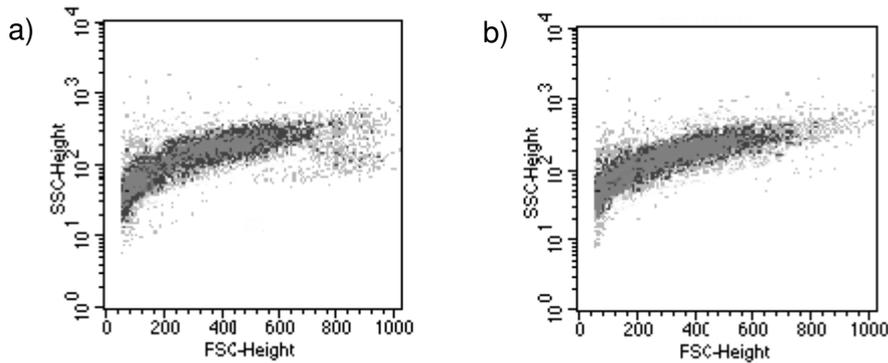


Abbildung 4.48: Nahezu unveränderte Morphologie im Light-Scatter bei Tunicamycin-behandelten Zellen, nach 2-stündigem Hitzeschock; a) Kontrolle mit SA-PE; b) Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE; Färbebedingung 2 – siehe Abschnitt 3.10.4

Um ausschließen zu können, dass Substanzen, die im Zuge der Aufreinigungs-, Biotinylierungs- oder Tetramerisierungsprozesse von CD83^{tet}:SA-PE in den Ansatz gelangen, diese Veränderungen bewirken, wurde bei diesem Versuch der Durchlauf des letzten Umpufferungsschrittes mit den Zentrifugenfilterröhrchen (Centricons, 3500 MWCO) als Kontrolle mitgeführt. Diese Kontrolle führte nicht zu den zuvor beschriebenen Veränderungen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das CD83-Fusionsprotein selbst diese Veränderung bewirkt.

Wurden die Zellen nur 2 Tage mit Tunicamycin behandelt, anstelle von 5 Tagen, fand man eine Aufspaltung in zwei Populationen (Abbildung 4.49), so dass man annehmen kann, dass erst nach 5 Tagen die *N*-Glykosylierung weitgehend gehemmt wurde, bzw. die auf der Oberfläche exprimierten Glykoproteine erneuert wurden.

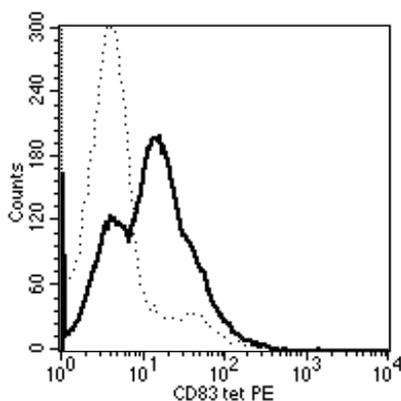


Abbildung 4.49: CD83L-Expression auf CEM-Zellen. Die Zellen wurden 2 Tage mit Tunicamycin behandelt. Gestresst wurden die Zellen durch einen 2-stündigen Hitzeschock bei 42 °C. Kontrolle mit SA-PE (gepunktete Linie); Färbung mit CD83^{tet}:SA-PE (durchgezogene Linie); Färbebedingung 3 – siehe Abschnitt 3.10.4

Diese Versuche deuten darauf hin, dass es sich beim CD83-Liganden um ein *N*-glykosyliertes Glykoprotein handelt.

4.2.10 Charakterisierung des CD83L durch Glycan Array

Zur näheren Charakterisierung von CD83L wurde in Kooperation mit dem Consortium for Functional Glycomics Core H (Oklahoma City, OK, USA) von Prof. Dr. Richard Alvarez ein Glycan Array durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.1 und Abbildung 4.50 dargestellt.

Mehrere Daten wurden von der Bewertung ausgeschlossen, da hierbei SA-FITC, welches zur sekundären Detektion eingesetzt wurde, an ungebundenes Biotin am Polyacrylamidgerüst gebunden hat. Hierzu gehören die in Abbildung 4.50 mit „PAA-Glycans“ gekennzeichneten Daten und die mit Nr. 162 gekennzeichnete Probe (Persönliche Kommunikation mit Richard Alvarez).

Von 155 auswertbaren Glykanstrukturen band das biotinylierte CD83-Fusionsprotein signifikant an 5 Glykanstrukturen. Drei dieser Glykane gehören zur Gruppe der *N*-Glykane. Als mögliche Bindungsmotive für CD83 wären nach diesem Glycan Array fucosylierte und sialylierte Strukturen und/oder Lewis-ähnliche Strukturen denkbar (Tabelle 4.1 und persönliche Kommunikation mit Richard Alvarez).

Tabelle 4.1: Glykane, welche von CD83 gebunden wurden:

Glycan No.	Glycan	Trivial Name	S/N
188	$\pm(\text{NeuAca3}(\text{GalNAcb4})\text{Galb4})\pm\text{NeuAca6}\pm\text{Galb4GlcNAcb2Mana6}(\pm\text{GlcNAcb4})(\pm(\text{NeuAca3}(\text{GalNAcb4})\text{Galb4})\pm\text{NeuAca6}\pm\text{Galb4GlcNAcb2Mana3})\text{Manb4GlcNAcb4}(\pm\text{Fuca6})\text{GlcNAcb};\text{N}\#\text{SP1.BT}$	mixed biantennary structures from Wehi cells	23.24
187	$\text{Galb4}(\text{Fuca3})\text{GlcNAcb2Mana6}(\text{Galb4}(\text{Fuca3})\text{GlcNAcb2Mana6})\text{Manb4GlcNAcb4GlcNAcb};\text{N}\#\text{SP1.BT}$	desialylated, fucosylated human apotransferrin	19.78
196		bisecting biantennary from horseradish peroxidase	12.52
172	$\text{GalNAca3}(\text{Fuca2})\text{Galb4GlcNAcb}\#\text{SP2.BT}$	A (type 2)	9.94
156	$\text{Neu5Aca8Neu5Aca8Neu5Aca}\#\text{SP6.BT}$	(Sia) ₃	8.13

4.2.11 Ligandencharakterisierung durch Western Blot und ESI-MS

Nach dem Glycan Array wurde analysiert, ob die identifizierten Carbohydratstrukturen nur in Zusammenhang mit ausgewählten Trägerproteinen als Liganden fungieren oder unabhängig von dem darunterliegenden Molekül. Hierzu wurden die zwei Fraktionen der lysierten Thymozyten durch Gelelektrophorese aufgetrennt, und durch Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für diesen Versuch wurden Thymozyten gewählt, da für sie in der durchflusszytometrischen Analyse eine hohe CD83^{tet}-Expression nachgewiesen worden war. Färbung mit CD83^{tet}:SA-HRP ergab für die Fraktion der unlöslichen Zellbestandteile eine intensive Tripelbande bei 33 kDa (Abbildung 4.51). Die Bindung war nicht von Ca²⁺-Ionen abhängig. Das Signal war eindeutig intensiver als das der Negativkontrolle mit SA-HRP.

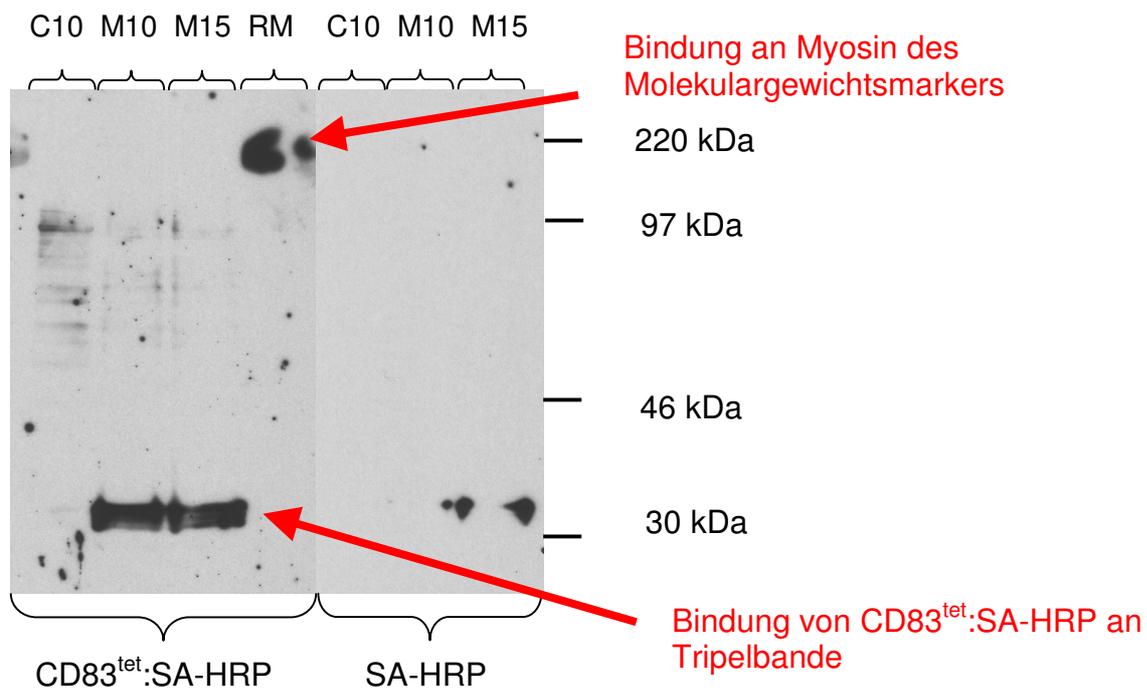


Abbildung 4.51: Western Blot lysierter Thymozyten, inkubiert mit CD83^{tet}:SA-HRP. Die Kontrolle wurde mit SA-HRP inkubiert. C steht für „cytosolische Fraktion“ – sie enthält die löslichen Proteine. M steht für „Membranfraktion“ – sie enthält die unlöslichen Zellbestandteile der Membran, aber auch des Zellkerns. Die Zahlen geben die Anzahl der Mikroliter an, die pro Tasche pipettiert wurden. RM steht für Rainbow marker® (Molekulargewichtsmarker der Firma Amersham).

In der zytosolischen Fraktion ließen sich mehrere schwächere Banden im Bereich zwischen 46 und 97 kDa erkennen.

Interessant ist die Tatsache, dass CD83^{tet}:SA-HRP auch an die oberste Bande des Molekulargewichtsmarkers gebunden hat. Diese Bindung konnte nur bei CD83^{tet}:SA-HRP, nicht aber bei der Negativkontrolle mit SA-HRP beobachtet werden. Bei dieser Bande handelt es sich um Myosin (aus Muskeln vom Kaninchen).

Zur näheren Charakterisierung wurde die oberste Bande der Tripelbande von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Stevanovic (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen) mittels ESI-MS analysiert.

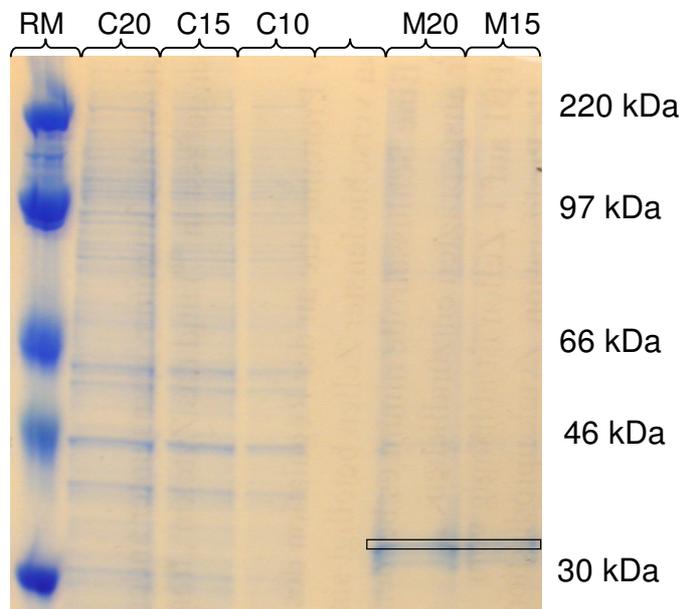


Abbildung 4.52: SDS-Gelelektrophorese, das Gel wurde nach der Coomassie-Methode gefärbt. Aufgetragen wurden die zwei Fraktionen der lysierten Thymozyten. C steht für „cytosolische Fraktion“ – sie enthält die löslichen Proteine. M steht für „Membranfraktion“ – sie enthält die unlöslichen Zellbestandteile der Membran aber auch des Zellkerns. Die Zahlen geben die Anzahl der Mikroliter an die pro Tasche pipettiert wurden. RM steht für Rainbow marker® (Molekulargewichtsmarker der Firma Amersham). Durch den Kasten wurde die Bande gekennzeichnet, die von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Stevanovic mit ESI-MS analysiert wurde.

Es konnten drei fragmentierte Peptide aus dem Histon H1 identifiziert werden. Davon stammen zwei Peptide aus dem Histon H1c (GeneID: 3006; PAAPAAAPPAEK und ASGPPVSELITK) und ein weiteres Peptid aus H1b (GeneID: 3009; ATGPPVSELITK).

5 Diskussion

5.1 Lektinfärbungen

Einige Bakterien und Parasiten sowie alle Viren vermehren sich innerhalb von Zellen. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) können infizierte Zielzellen, aber auch maligne entartete Zellen des Körpers selbst abtöten („Immunesurveillance“). Dabei unterscheiden sie zwischen immunologischem Selbst und Nicht-Selbst, zwischen physiologischem und pathologischem Zustand. Außerdem ist das Immunsystem in der Lage, potenziell autoaggressive T-Zellen, die die Negativselektion im Thymus fälschlicherweise überwunden haben, später in der Peripherie zu unterdrücken. Auch mit der Nahrung aufgenommene oder bakterielle Proteine aus der Darmflora könnten eine unerwünschte Immunreaktion auslösen, tun dies aber nur selten. Diese Beispiele machen deutlich, dass das Immunsystem nicht nur Mechanismen zur Aktivierung, sondern auch zur Regulation und Beendigung einer Immunantwort besitzt. Hierzu gehören einerseits Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und Transforming Growth Factor β (TGF- β), andererseits aber auch ein Netzwerk von spezialisierten Leukozyten. Zu diesen regulatorisch wirkenden Zellen gehören die natürlichen regulatorischen T-Zellen (nT_{reg}) und die Dendritischen Zellen (DC). Der Mechanismus, über den diese Zellen regulatorisch wirken, konnte bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es ist bekannt, dass nT_{reg} zur Ausübung ihrer Funktion direkten Zell-Zell-Kontakt benötigen (Hori et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aspekt beleuchtet, der vielen heute üblichen Screeningverfahren entgeht: die Glykosylierung der Oberflächenproteine (Rudd et al., 2001). Besondere Bedeutung kommt der Sialinsäure als terminalem Kohlenhydratrest zu, da diese Glykosylierung besonders aufwendig reguliert wird und für sie inhibitorische Rezeptoren bekannt sind – die Siglecs (Crocker und Varki, 2001). Unter folgender Arbeitshypothese sollen nun die erhaltenen Ergebnisse betrachtet werden:

Die Interaktionen zwischen Sialinsäuren und Siglecs sind an der Feinregulierung des Immunsystems beteiligt. Durch ihre intrazelluläre ITIM-Sequenzen können Siglecs

inhibitorische Signale an Effektorzellen vermitteln und dadurch die Aktivierungsschwelle erhöhen.

5.1.1 Sialylierung auf Dendritischen Zellen

DC sind eine zentrale Schaltstelle in unserem Immunsystem. Reife DC sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen und sie sind potente T-Zell-Stimulatoren, während unreife DC Toleranz induzieren (Dhodapkar et al., 2001). In einer Arbeit aus dem Jahre 1989 konnte gezeigt werden, dass MHC I Moleküle auf den DC weniger sialyliert sind als die MHC I Moleküle anderer APZ. Durch Desialylierung konnte auch bei anderen APZ eine verbesserte stimulatorische Fähigkeit erreicht werden (Boog et al., 1989). Seither gab es keine Veröffentlichungen bezüglich der Sialylierung von DC mehr.

Durch Lektinfärbungen mit MAL II und SNL konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure auf reifen DC niedriger war, als auf unreifen DC. Die Dichte an α 2,3-gebundener Sialinsäure blieb weitgehend gleich. Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut mit Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe vereinbaren, wobei nachgewiesen wurde, dass mRNA von Sialyltransferasen in den beiden DC Populationen unterschiedlich exprimiert werden. Die mRNA der α 2,3-Sialyltransferase (ST3Gal VI) war in reifen DC um das 6,3-fache heraufreguliert, während die mRNA der α 2,6-Sialyltransferase (ST6Gal I) um den Faktor 2,6 vermindert war (Jenner et al., submitted). Die Expression von mRNA korreliert nicht immer mit der Enzymaktivität, des Weiteren wird der Phänotyp der Sialylierung nicht nur durch Sialyltransferasen, sondern auch z. B. durch Neuraminidasen beeinflusst, so dass erklärt werden kann, warum sich die Erhöhung der α 2,3-Sialyltransferase nicht im Phänotyp äußert. α 2,6-verknüpfte Sialinsäure stellt einen potenziellen Liganden für Siglec-2, -3, -5, -7, -8, -9 und 10 dar (Varki und Angata, 2005). Dies könnte die Grundlage für die inhibitorische Wirkung unreifer DC sein, da nahezu alle Zellen des Immunsystems ein oder mehrere Mitglieder der Siglec-Familie auf der Oberfläche tragen (Varki und Angata, 2005).

Mehrere Gruppen haben die Rolle von DC in Influenzainfektionen untersucht und Dhodapkar et al. waren in der Lage, Toleranz gegenüber einem Influenzaprotein zu induzieren, indem sie unreife DC benutzten (Dhodapkar et al., 2001). In diesem

Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass verschiedene Hämagglutinine von Influenzavirus-Isolaten unterschiedlich an DC binden. Könnte es vielleicht sein, dass die unterschiedliche Dichte von Sialinsäure auf unreifen, tolerogenen DC für Influenzaviren eine Möglichkeit eröffnet, einer Immunantwort in der Initialphase der Infektion zu entkommen? Interessanterweise binden humanpathogene Influenzaviren bevorzugt an α 2,6-gebundene Sialinsäure, die eben auf unreifen DC in hoher Dichte vertreten ist (Connor et al., 1994).

Antitumorvakzinierungen mit DC sind Gegenstand aktueller Forschung und klinischer Studien. In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, ob sich durch Veränderung der Sialylierung die Effektivität steigern lassen würde. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen, wäre der Einsatz enzymatisch desialylierter DC im Rahmen von Antitumorvakzinierungen im Mausmodell. Eine weitere Möglichkeit die Sialylierung von DC zu beeinflussen, wäre durch Transfektion mit siRNA gegen ausgewählte Sialyltransferasen.

5.1.2 Sialylierung auf verschiedenen T-Zellpopulationen und ihre Veränderung bei Aktivierung

In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie sich die Sialylierung bei Stimulation verschiedener T-Zell-Subpopulationen verhält. Diese Versuche sind insofern interessant, da zwar über den Sialylierungszustand von naiven und aktivierten CD8⁺ T-Zellen schon viel publiziert wurde, nicht aber über CD4⁺ T-Zellen. Innerhalb dieser Subpopulation befinden sich auch die natürlichen regulatorischen T-Zellen. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass für deren toleranzinduzierende Wirkung Zell-Zell-Kontakt notwendig ist (Jonuleit et al., 2002; Hori et al., 2003). CD25, CTLA-4 und GITR konnten als wichtige Marker identifiziert werden (Sakaguchi, 2005).

Könnte die Sialylierung für die Funktion der regulatorischen T-Zellen eine Rolle spielen? Für die Sialylierung von Glykoproteinen stehen mindestens 18 verschiedene Sialyltransferasen zur Verfügung, die eng kontrolliert werden und die Sialinsäure über unterschiedliche Positionen anbinden (Harduin-Lepers et al., 2001). Demgegenüber existieren Neuraminidasen, die Sialylreste vom übrigen Oligosaccharid abspalten können. Diese Vorgänge finden in Abhängigkeit vom

Funktionszustand der Zelle statt und sind entwicklungsgeschichtlich konserviert (Metzler et al., 1994; Kelm und Schauer, 1997). Für die Sialinsäuren existieren spezifische Rezeptoren – die Siglecs. Diese werden auf nahezu allen Zellen des Immunsystems exprimiert und sind in der Lage durch ihre ITIM-Sequenz intrazellulär ein inhibitorisches Signal zu vermitteln (Ravetch und Lanier, 2000; Crocker und Varki, 2001). In dieser Arbeit wurde an frisch isolierten und aktivierten PBMC und T-Zellsubpopulationen der Sialylierungsgrad mit den Lektinen SNL (bindet präferentiell an α 2,6-gebundene Sialinsäure) und MAL II (bindet präferentiell an α 2,3-gebundene Sialinsäure) untersucht. Bei den frisch isolierten PBMC und CD4⁺ T-Zellen zeigte sich häufig, dass es in dieser Population sowohl SNL^{hoch} als auch SNL^{niedrig} Populationen gab (Abbildungen 4.7 und 4.10). Dieser Doppelpeak war abhängig von Spender und Zeitpunkt. Um zu überprüfen, ob sich die Populationen mit unterschiedlichem Sialylierungsstatus auch durch andere Aktivierungsmarker unterscheiden lassen, wurden drei Aktivierungsmarker untersucht, nämlich CD62L, CD69 und CD27. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Populationen nicht durch diese Marker unterscheiden lassen.

Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen galt das besondere Interesse den CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, da unter diesen auch die regulatorischen T-Zellen zu finden sind. Bei näherer Betrachtung dieser Subpopulation zeigte sich auch hier eine Aufspaltung in SNL^{hoch} T-Zellen und SNL^{niedrig} T-Zellen (Abbildung 4.11). Es fällt auch auf, dass man durch Aufreinigung von CD25^{hoch} aus den CD4⁺ T-Zellen keine Anreicherung der SNL^{hoch} positiven Zellen bekommt, wie es ursprünglich für diese regulatorisch wirkende Population erwartet worden war. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass es innerhalb der regulatorischen T-Zellen verschiedene Aktivierungszustände gibt. Es gibt Hinweise, dass in vivo ein Signal über den TCR gebraucht wird, um die Suppressorfunktion zu induzieren (Fontenot und Rudensky, 2005). Des Weiteren ist IL-2 für die in vivo und in vitro Aktivierung von T_{reg} Zellen wichtig (Furtado et al., 2002; Thornton et al., 2004). So könnte es sich bei den SNL^{niedrig} CD4⁺CD25⁺ T-Zellen um noch nicht aktivierte regulatorische T-Zellen handeln, während es sich bei den SNL^{hoch} CD4⁺CD25⁺ T-Zellen um aktivierte regulatorische T-Zellen handelt.

Nachdem man ursprünglich davon ausgegangen war, dass sich T_{regs} in vitro nicht expandieren lassen, konnte nachgewiesen werden, dass es durchaus möglich ist,

diese Zellpopulation *in vitro* zu expandieren, ohne dass sie ihre Funktion verlieren (Levings et al., 2001; Tang et al., 2004).

Nach Expansion und Aktivierung verschiedener Subpopulationen mit allogenen bestrahlten PBMC, plattengebundenem OKT3 und IL-2 präsentierten sich die CD4⁺ Population und die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit einem höheren Grad an α 2,6-gebundener Sialinsäure (Abbildungen 4.10 und 4.11). Für die Sialinsäure in α 2,3-Bindung ließen sich keine Unterschiede erkennen. Depletierte man jedoch die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ Subpopulation, wurde die α 2,6-Sialinsäuredichte durch Aktivierung leicht nach unten reguliert (Abbildung 4.12). Damit nahmen die T-Zellen in Bezug auf das Sialylierungsmuster einen aktivierten Phänotyp ein, nachdem die T_{regs} eliminiert waren. Waren also in einem Versuchsansatz die regulatorischen T-Zellen noch enthalten, konnten sie ihren Phänotyp auf die anderen CD4⁺ T-Zellen übertragen – nach einer Woche präsentierten sich alle Zellen im Ansatz SNL^{hoch} wie die meisten T_{regs} selbst. Wurden die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen entfernt, fand keine Heraufregulierung statt.

Geht man davon aus, dass Sialinsäure-Siglec-Interaktionen für die Funktion der regulatorischen T-Zellen eine Rolle spielen, ist hierfür Zell-Zell-Kontakt unentbehrlich. Während in den Untersuchungen von Jonuleit et al. die neu entstandenen regulatorischen T-Zellen ihre Suppressoraktivität Zellkontakt-unabhängig ausübten, konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, dass aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen regulatorische CD4⁺CD25⁺ T-Zellen entstehen können, die ihre Suppressoraktivität zellkontaktabhängig ausüben (Jonuleit et al., 2002; Walker et al., 2003). Durch Stimulation mit α CD3 und α CD28 wurden aus humanen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen generiert, welche FoxP3 positiv waren.

Regulatorische T-Zellen stellen keine einheitliche Population dar. Die Definition der verschiedenen Subpopulationen und ihre unterschiedlichen Eigenschaften, auch bezüglich der Ausübung ihrer suppressiven Aktivität, könnte die unterschiedlichen Sialylierungsmuster als ein weiteres phänotypisches Kriterium heranziehen. Die Tatsache, dass sich CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach Aktivierung SNL^{hoch} präsentieren, könnte darauf hindeuten, dass die Sialylierung auch für die Funktion regulatorischen T-Zellen eine Rolle spielt.

Wie wirkt sich die polyklonale Stimulierung auf die CD8⁺ T-Zellpopulation aus? Durch polyklonale Stimulierung gehen ruhende CD8⁺ T-Zellen in den aktivierten Zustand über. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Übergang vom nicht-aktivierten zum aktivierten Zustand mit einer Verminderung der Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure einhergeht (Abbildung 4.8). Für α 2,3-gebundene Sialinsäure konnte nur teilweise eine geringere Dichte nach Aktivierung nachgewiesen werden (Abbildung 4.9).

Diese Veränderungen konnten allerdings nur beobachtet werden, wenn CD8⁺ T-Zellen allein stimuliert wurden. Wurden PBMC stimuliert, zeigten die CD8⁺ T-Zellen ein anderes Verhalten – sie wiesen nach der Stimulierung einen SNL^{hoch} Phänotyp auf (Abbildung 4.7). Wie kann dieser Unterschied erklärt werden? Werden isolierte CD8⁺ T-Zellen stimuliert, sind keine regulatorischen Zellen zugegen, so dass sie ungehindert auf einen Aktivierungsstimulus antworten können. Im Ansatz der PBMC sind auch die regulatorischen Zellen enthalten, die CD8⁺ T-Zellen können ihre Effektorfunktion nicht voll entfalten und behalten auch das Glykosylierungsmuster eines nicht aktivierten CTL bei. Eine Desialylierung von aktivierten CD8⁺ T-Zellen wird auch in der Literatur beschrieben (Casabo et al., 1994; Galvan et al., 1998; Pappu und Shrikant, 2004). Auch in einem in vivo Versuch konnte nachgewiesen werden, dass CD8⁺ T-Zellen während ihrer Aktivierung desialyliert werden (Pappu und Shrikant, 2004). Des Weiteren konnte in der gleichen Arbeit gezeigt werden, dass durch biochemische Desialylierung naiver T-Zellen ihre Sensitivität für agonistische und partiell agonistische Peptide erhöht wird. Diese Ergebnisse werden durch eine Studie bestätigt, in der für aktivierte CD8⁺ T-Zellen von akut virusinfizierten Mäusen ein PNA^{hoch} Phänotyp gefunden wurde (Galvan et al., 1998). Außerdem war in diesen Zellen die Enzymaktivität der Neuraminidase erhöht. Diese erhöhte Enzymaktivität ist höchstwahrscheinlich für den PNA^{hoch} Phänotyp durch Abspaltung der Sialinsäurereste von Core-1 O-Glykanen verantwortlich (Galvan et al., 1998). Mit PNA kann indirekt eine Desialylierung des Core-1 O-Glykans untersucht werden. Die α 2,6-Sialylierung von N-Glykanen wurde in beiden Studien nicht untersucht.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte für die α 2,3-gebundene Sialinsäure nur ein geringer Unterschied zwischen nicht-aktivierten und aktivierten CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Dies könnte daran liegen, dass diese

Ergebnisse durch in vitro Versuche mit humanen Zellen ermittelt wurden, während die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse durch in vivo Studien im Mausmodell entstanden sind.

Welche Bedeutung hat die verminderte Sialylierung im Zusammenhang mit der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen? Durch biochemische Desialylierung - es wurden sowohl Sialinsäuren in α 2,6- als auch in α 2,3-Bindung abgespalten – konnte für CD8⁺ eine erhöhte Sensitivität gegenüber agonistischen und partiell agonistischen Peptiden nachgewiesen werden (Pappu und Shrikant, 2004). Die Desialylierung verstärkte die frühe Aktivierung und verkürzte die Dauer an TCR-Stimulierung, die für Proliferierung und Differenzierung benötigt wurde. Auch konnte für naive T-Zellen nach Desialylierung eine verstärkte Antwort auf Tumor-präsentierte Antigene gezeigt werden. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte einen Zusammenhang zwischen erhöhter Neuraminidaseaktivität in aktivierten T-Zellen, einer dadurch verminderten Sialylierung, und daraus folgend einem verbesserten Ansprechen auf allogene B-Zell-Stimulierung nachweisen (Taira und Nariuchi, 1988). Was bewirkt die Desialylierung in den aktivierten T-Zellen? Die Desialylierung hat einen Einfluss auf die Formierung der immunologischen Synapse, und kann dadurch die Sensitivität von CD8⁺ T-Zellen erhöhen (Daniels et al., 2001; Starr et al., 2003). Durch die Desialylierung im Zuge der Aktivierung können aber auch Siglecs demaskiert werden, die auf der Oberfläche in *cis*-Bindung vorliegen. Durch diesen Verlust der Bindung von Siglecs an Sialinsäure fällt das ITIM-vermittelte inhibierende Signal weg – und so sinkt die Aktivierungsschwelle der Zellen.

Mit den Lektinfärbungen konnte experimentell gezeigt werden, dass es durch Aktivierung der Zellen phänotypabhängig zu einer Veränderung der Sialylierung kommt. Regulatorisch wirkende Zellen wie die unreifen DC und die T_{regs} wiesen nach Aktivierung eine hohe Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure auf, zytotoxische CD8-Effektorzellen hingegen eine niedrige Dichte. Diese Ergebnisse können als Grundlage für funktionelle Untersuchungen dienen.

5.1.3 Sialylierung von soliden Tumoren

Veränderungen in der Glykosylierung sind ein früher Schritt im Prozess der malignen Entartung (Hakomori, 2002). In der Literatur sind Berichte über T-Zellen zu finden, die tumorspezifisch sind, tatsächlich auch in den Tumor einwandern, ihn dann aber

schließlich nicht attackieren (Mukherjee et al., 2001). In diesem Zusammenhang ist eine Veröffentlichung von Bedeutung, die besagt, dass 26 von 28 Colonicarcinomen α 2,6-gebundene Sialinsäure in hoher Dichte auf ihren Oberflächen konjugiert haben, während physiologisches Colongewebe negativ für diese posttranslationale Modifikation ist (Murayama et al., 1997). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, dass die Zelloberflächensialylierung Einfluss auf die Tumorzellerkennung in einer Mixed Lymphocyte Reaction haben kann. So induzierte eine Lymphom-B-Zelllinie nach enzymatischer Desialylierung eine verstärkte Proliferation von Thymozyten in der MLR (Powell et al., 1987).

Für Siglec-2, -3, -5, und -6 konnte eine signifikante Bindung an sialyl-Tn nachgewiesen werden (Brinkman-Van der Linden und Varki, 2000). Sialyl-Tn ist ein Disaccharid welches häufig auf verschiedenen Krebsarten gefunden wird und als diagnostischer Marker dient (Ogawa et al., 1996; Brockhausen et al., 1998; Orntoft und Vestergaard, 1999). In vielen Studien war eine hohe Expression dieses Antigens mit einer schlechten Prognose verbunden (Itzkowitz et al., 1990; Ogata et al., 1992; Ogawa et al., 1996). Wurde maligne entartetes Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe analysiert, so konnte eine Sialylierung des Gewebes nur im malignen Bereich festgestellt werden (Wang et al., 2001; Tang et al., 2003). Für das colorectale Adenom, einer prä-malignen Vorstufe des Colonicarcinoms, konnte schon intrazellulär im Golgi-Apparat sialyliertes Tn nachgewiesen werden.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden Zelllinien verschiedener Tumoren untersucht, die ein hohes Metastasierungspotential und eine ungünstige Prognose aufweisen. Es wurden zwei humane Rhabdomyosarkomzelllinien, die Zelllinie eines humanen Melanoms und die eines hepatozellulären Karzinoms auf Sialinsäureexpression hin analysiert. Tumoren könnten ihre erhöhte Sialylierung benutzen, um durch Interaktion mit Siglecs, exprimiert auf Effektorzellen, eine Immunantwort abzuschwächen bzw. zu unterdrücken. Einen weiteren Hinweis darauf liefern auch die Ergebnisse dieser Arbeit, denn für alle untersuchten Zelllinien konnte eine hohe Dichte von Sialylierungen nachgewiesen werden (Abbildung 4.14). Dennoch ist das Ergebnis auch kritisch zu betrachten – die Zelllinien sind zum Teil sehr alt (RD gibt es schon seit 1969). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Glykosylierung in dieser langen Zeit ex vivo verändert hat. Es fehlt sicherlich noch die Untersuchung des Sialylierungsstatus frisch entnommener Tumoren im Vergleich zu entsprechendem gesundem Gewebe. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der

Sialylierungsstatus mit pflanzlichen Lektinen untersucht. Diese Ergebnisse werden an Relevanz gewinnen, wenn man sie mit Ergebnissen, die mit rekombinant exprimierten Siglecfusionsproteine gewonnen werden, korrelieren kann. Des Weiteren stehen funktionelle Assays aus, z. B. Zytotoxizitätsassays mit und ohne Blockade der Sialinsäurebindungsstellen auf den Tumoren durch Siglecfusionsproteine.

In Zusammenhang mit der Behandlung bestimmter Tumorzelllinien mit den antiproliferativ wirkenden Zytokinen TNF- α und IFN- γ konnte bei manchen dieser Zelllinien eine verstärkte MUC1-Expression nachgewiesen werden (Lagow und Carson, 2002; O'Connor et al., 2005). Deshalb wurde untersucht, ob durch eine Behandlung mit diesen Zytokinen ein Effekt auf die Sialylierung beobachtet werden kann. Bei der Rhabdomyosarkomzelllinie A204 konnte hierdurch eine leichte Heraufregulierung von α 2,6-gebundener Sialinsäure beobachtet werden (Abbildung 4.15).

Dieses Ergebnis könnten auf einen Tumor-escape-Mechanismus hindeuten, wobei der Tumor bei einer gegen ihn gerichteten Immunantwort die Präsenz der α 2,6-gebundenen Sialinsäure auf seiner Oberfläche erhöht. Durch inhibitorisch wirkende Siglecs auf Effektorzellen könnte durch Ligandbindung eine Immunantwort vermindert werden.

5.1.4 Sialylierung auf Leukämie-Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Sialylierungsgrad verschiedener Leukämie-Zelllinien untersucht. Es zeigte sich eine unterschiedliche Sialylierung, welche vom Differenzierungsgrad der Zelllinie abhing. Je höher die Differenzierung war, desto niedriger war die Sialylierung. Für PLB-985 (FAB Klassifizierung: M4) wurde mit MAL II und SNL mit Abstand die niedrigste Sialylierung festgestellt (Abbildung 4.16). Schaut man nun auf die Rezeptorseite ist in diesem Zusammenhang eine Veröffentlichung von Vitale et al. von Interesse. Sie zeigt, dass Siglec-7 auf Zellen der akuten myeloischen Leukämie erst ab M4 (nach der Französisch-Amerikanisch-Britischen Einteilung), nicht aber auf M1, M2 und M3 exprimiert wird. Sowohl für Siglec-7 als auch für Siglec-3 konnte in vitro ein antiproliferativer Effekt

nachgewiesen werden. Durch Quervernetzung von Siglec-3, welches auf 28 von 29 AML-Zelllinien nachgewiesen wurde, konnte Apoptose induziert werden (Vitale et al., 2001). Die niedrigere Sialylierung könnte also für die Zellen einen Vorteil haben, da Sialinsäuren auch als Liganden für Siglecs auf derselben Zelle dienen können (Kelm et al., 2002). Durch die niedrigere Sialinsäuredichte ständen so für die antiproliferativ-wirkenden Siglecs weniger Liganden zur Verfügung.

5.1.5 Zusammenfassende Betrachtung und kritische Bewertung der Versuche

Für toleranzinduzierende unreife DC wie auch für regulatorische T-Zellen konnte eine erhöhte Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure detektiert werden (Abbildung 4.5 und 4.11), wogegen reife DC und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen eine geringere Dichte an α 2,6-verknüpfter Sialinsäure auf ihren Oberflächenproteinen exprimierten (Abbildungen 4.5 und 4.8). So könnte die α 2,6-gebundene Sialinsäure potenzielle Relevanz für die inhibitorischen Effekte von unreifen DC und regulatorischen T-Zellen aufweisen, indem hier Liganden für die inhibitorischen Siglecs auf Effektorzellen exprimiert werden. Auch auf verschiedenen Tumorzelllinien konnte sowohl eine α 2,3- als auch α 2,6-Sialylierung nachgewiesen werden. Die bisher erhaltenen Ergebnisse wurden durch Färbungen mit pflanzlichen Lektinen erhalten, deren Spezifität eingeschränkt ist. Sie sind in funktionellen Assays nicht einsetzbar, weil sie mehrere Bindungsstellen besitzen und so bereits quervernetzend und aktivierend wirken können. Diese Lektine wurden verwendet als Surrogatparameter, da rekombinant exprimierte Siglecfusionsproteine zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch nicht zur Verfügung standen. Durch die lang andauernde aber endlich gelungene Etablierung der Expression der extrazellulären Domäne von Siglecs steht jetzt ein neues wichtiges Instrument zur Verfügung. Es kann sowohl in der durchflusszytometrischen Analyse eingesetzt werden, als auch in funktionellen Assays. Die niedrige Affinität der Siglecs gegenüber ihren Liganden kann durch eine elegante Methode, die aus der MHC-Forschung bekannt ist, überwunden werden – der Tetramerisierung. Von großer Bedeutung ist auch ihr Einsatz in Zytotoxizitätsassays. Hierbei muss nachgewiesen werden, dass sie kompetitiv die Wirkung von T_{reg} unterbinden können. Das würde die Kernhypothese

bestätigen, dass bestimmte Sialinsäuremodifikationen die Suppressorwirkung von T_{reg} vermitteln.

Außerdem sind sie ein wichtiges Instrument, um die in den Tumor- und Leukämie-Zelllinien gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen und den Aspekt des möglichen Immune-Escape-Mechanismus durch differenzielle Sialylierung von Tumoren näher zu beleuchten.

5.2 CD83

CD83, ein strukturhomologer Rezeptor zu den Siglecs, wird auf reifen DC und aktivierten T-Zellen exprimiert. (Zhou et al., 1992; McKinsey et al., 2000; Munster et al., 2004). Sein Ligand konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Um im Rahmen dieser Arbeit den Liganden näher zu charakterisieren, wurden durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe des CD83-His-Tag-Fusionsproteins durchgeführt. Hierbei konnte eine Bindung von CD83-Fusionsprotein an apoptotische und nekrotische humane Lymphozyten und Thymozyten nachgewiesen werden (Abbildungen 4.30 und 4.36). Da CD83 physiologisch glykosyliert vorliegt, wurden zur Expression des CD83-Fusionsproteins Säugetierzellen benutzt, um ein Glykosylierungsmuster möglichst nahe an dem des Menschen zu erhalten (Cao et al., 2005). Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen CD83 und der Siglec-Familie wurde bereits früh angenommen, dass der Ligand ein glykosyliertes Molekül ist. Da die Affinität zwischen Lektinen und ihren glykosylierten Liganden oft sehr gering ist, wurde das CD83-Fusionsprotein tetramerisiert um die Avidität zu erhöhen, so dass das Fusionsprotein auch für Färbungen in der durchflusszytometrischen Analyse einsetzbar ist.

Im Gegensatz zu bereits zitierten Berichten (Scholler et al., 2001) konnte CD83L auf Monozyten innerhalb frisch isolierter PBMC nicht nachgewiesen werden. In der durchflusszytometrischen Analyse war die Bindung von CD83-Fusionsprotein an Monozyten zwar höher als die Bindung an Lymphozyten, betrachtete man jedoch die adäquate Negativkontrolle, nämlich Monozyten inkubiert mit SA-PE, war die Bindung nicht höher als diese.

Wurden frisch isolierte PBMC untersucht, so präsentierten sich nur sehr wenige Zellen CD83L positiv. Durch Gegenfärbungen konnten diese Zellen keiner bestimmten Population zugeordnet werden. Innerhalb frisch aufgereinigter PBMC befinden sich nur sehr wenige apoptotische Zellen, so dass hierin die Erklärung liegen könnte, warum nicht mehr Zellen CD83L positiv waren.

In einer früheren Studie war für reife und unreife DC beschrieben worden, dass sie den Liganden auf der Oberfläche tragen (Lechmann et al., 2001). Zur Überprüfung dieser Ergebnisse mit dem in dieser Arbeit verwendeten CD83-Fusionsprotein wurden verschiedene Färbungen Dendritischer Zellen durchgeführt. Im peripheren venösen Blut zirkuliert eine kleine Population an DC. Für diese Population konnte in der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt werden, dass sie nicht CD83 positiv ist (Abbildung 4.28). In weiteren Versuchen wurden aus isolierten Monozyten reife und unreife DC generiert. Auch innerhalb dieser Populationen waren nur wenige Zellen CD83L positiv (Abbildung 4.29). Der Prozentsatz der Zellen, die CD83^{tet}:SA-PE banden, lag höher als bei den PBMC. Zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Analyse befanden sich diese Zellen allerdings schon mehrere Tage in Kultur ex vivo, so dass sich mehr Zellen in Apoptose befanden, als bei frisch aufgereinigten Zellen, was den höheren Prozentsatz der CD83L positiven Zellen erklären könnte. Mit den hier erhaltenen Ergebnissen konnte also nicht bestätigt werden, dass sich CD83L auf reifen und unreifen DC befindet. Bei der durchflusszytometrischen Analyse handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, die auch die Detektion der Zellvitalität erlaubt. Die Zellvitalität wurde im Rahmen des Plattenadhäsionsassays, mit dem Lechmann et al. eine Bindung von CD83 an reife und unreife DC nachwies, nicht untersucht (Lechmann et al., 2001).

In weiteren Versuchen wurden lymphatische Organe auf CD83L-Expression untersucht. Innerhalb von Lymphknoten und Thymus ließ sich der Ligand dabei auf permeabilisierten CD45⁺ Zellen nachweisen (Abbildungen 4.31 und 4.39). Die weitere Charakterisierung durch Gegenfärbung ergab, dass im Lymphknoten der Ligand sowohl unter permeabilisierten CD8⁺ und CD8⁻ Lymphozyten als auch unter permeabilisierten CD4⁺ und CD4⁻ Zellen zu finden war (Abbildung 4.32). Auch im Thymus konnte der CD83L sowohl unter permeabilisierten CD8⁺ und CD8⁻ Thymozyten, als auch unter CD4⁺ und CD4⁻ Thymozyten nachgewiesen werden (Abbildung 4.39).

Weiterhin konnte experimentell gezeigt werden, dass durch Apoptoseinduktion die Anzahl der Zellen, die CD83L exprimieren, zunimmt. So konnte dies für doppelpositive Thymozyten durch Apoptoseinduktion mit Dexamethason gezeigt werden, aber auch für die T-Zelllinie CEM nach Inkubation mit Staurosporin oder nach Stress durch Hitzeschock (Abbildungen 4.43 und 4.44).

CD83 gehört wie die Siglecs zur I-Typ Lektinfamilie. Sowohl diese Tatsache, als auch Ergebnisse von Desialylierungsversuchen sprechen dafür, dass es sich beim Liganden von CD83 um eine glykosylierte Struktur handelt (Zhou et al., 1992; Scholler et al., 2001). Durch Inkubation von CEM-Zellen mit dem *N*-Glykosylierungshemmer Tunicamycin konnte die Bindung von CD83 aufgehoben werden (Abbildung 4.46). Darüber hinaus lieferte ein weiteres Experiment Hinweise, dass es sich beim Liganden von CD83 um das Produkt einer *N*-Glykosylierung handeln könnte. In Kooperation mit Prof. Dr. Richard Alvarez (Consortium for Functional Glycomics Core H, Oklahoma City, OK, USA) konnten in einem Glycan Array gegen 155 verschiedene Glykanmotive fünf Glykane identifiziert werden, an die das CD83-Fusionsprotein gebunden hat (Tabelle 4.1). Drei dieser Glykosylierungsmuster gehören zum *N*-Glykosylierungsweg (Nr 187, 188 und 196 aus Tabelle 4.1). Ein Element eines gemeinsamen Bindungsmotivs für CD83 könnte Fucose darstellen, während Sialinsäuren in unterschiedlichen Verknüpfungen ebenfalls in zwei von fünf Glykanen mit CD83-Affinität vorkamen.

Dies ist der erste Glycan Array der zur näheren Charakterisierung des Glykosylanteils des CD83L durchgeführt wurde. Unklar bleibt weiterhin um welches Trägermolekül es sich bei CD83L handelt, und welchen Einfluss der Proteinanteil oder der Lipidanteil auf die Bindung hat.

In den durchflusszytometrischen Analysen konnte der CD83L sowohl auf apoptotischen als auch auf nekrotischen Zellen nachgewiesen werden. Hierbei besteht bekanntermaßen die Gefahr, dass es sich nicht um spezifische sondern um unspezifische Bindungen handelt, wenn keine geeigneten Kontrollen mitgeführt werden. Verschiedene Punkte sprechen aber bei den hier vorgestellten Ergebnissen für eine spezifische Bindung. Es handelt sich, insbesondere bei den Lymphozyten und Thymozyten um eine sehr intensive Färbung. Die CD83L positive Population ist besonders bei den Lymphozyten deutlich von der CD83L negativen Population abgesetzt. Polyglobin, humanes Albumin und FCS im Färbeansatz verminderten die

Bindung von CD83 nicht. Vor allem aber zeigten sich nicht alle apoptotischen Zellen CD83L positiv. Die hier erhaltenen Ergebnisse stehen in diesem Aspekt im Einklang mit den Ergebnissen einer Publikation, in welcher CD83L auf einer Untergruppe aktivierter oder gestresster CD8⁺ T-Zellen und auf zwei von fünf T-Zelllinien, insbesondere im Zusammenhang mit Apoptose gefunden wurde (Scholler et al., 2001).

Zur näheren Charakterisierung wurden zusätzlich zur durchflusszytometrischen Analyse proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt. CD83^{tet}:SA-HRP band im Western Blot mit lysierten Thymozyten an eine breite Proteinbande die bei 30-35 kDa detektiert werden konnte (Abbildung 4.51). Mit Hilfe von ESI-MS analysierte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Stevanovic (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Tübingen) diese Bande und identifizierte drei Peptide aus Histon H1. Histon H1 hat ein Molekulargewicht von 22 kDa, wandert aber aufgrund vieler positiv geladener Aminosäuren im Elektrophoresegel langsamer und kann bei ca. 33 kDa detektiert werden (Brix et al., 1998). Histone sind wichtig für die Organisation der Chromatinstruktur in eukaryotischen Zellen. Hier spielen sie eine essenzielle Rolle sowohl in der Regulation der Genexpression als auch in der Kontrolle der Änderungen der nukleosomalen Struktur (Ramakrishnan, 1997; Thomas, 1999). Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass Histon H1.2 in der Apoptoseinduktion nach DNA-Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielt, indem es die Cytochrom c Freisetzung aus Mitochondrien induziert (Konishi et al., 2003). Obwohl für Histone gezeigt wurde, dass sie in Zusammenhang mit Apoptose auf der Zelloberfläche nachweisbar sind (Brix et al., 1998; Radic et al., 2004), scheint es dennoch unwahrscheinlich, dass sie einen möglichen Liganden für CD83 darstellen. Für Histon H1 sind in der Literatur verschiedene posttranslationale Modifikationen beschrieben worden, wie z. B. die Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung und ADP-Ribosylierung (Strahl und Allis, 2000). Histone werden jedoch nicht glykosyliert, so dass dieses Ergebnis nicht mit den Ergebnissen vereinbar ist, die darauf hinweisen, dass es sich beim Liganden von CD83 um ein N-glykosyliertes Molekül handelt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es zwischen dem Histonprotein und CD83^{tet}:SA-HRP unter den gewählten Versuchsbedingungen zu unspezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen kam.

Zusammenfassend können aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten folgende Schlüsse gefasst werden: Bei dem Liganden von CD83 handelt es sich um ein *N*-glykosyliertes Molekül. Hierfür sprechen die Ergebnisse des Tunicamycin-Versuchs und die Ergebnisse des von Prof. Dr. Richard Alvarez durchgeführte Glycan Array, wobei drei der fünf Glykosylierungsmuster, an die das CD83-Fusionsprotein gebunden hat, zum *N*-Glykosylierungsweg gehören. Darüber hinaus wird der Ligand im Rahmen der Apoptose durchflusszytometrisch detektierbar. Dies konnte sowohl für humane Thymozyten als auch für Lymphozyten aus Lymphknoten gezeigt werden.

Die Funktion des bzw. der möglichen Liganden bleibt jedoch ungeklärt. Ein intrazelluläres Signalmotiv konnte für CD83 bisher nicht identifiziert werden, so dass eine Rolle für CD83 und seinen Liganden in der Signaltransduktion nicht angenommen werden kann. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass CD83^{tet}:SA-PE an apoptotische Zellen bindet. Somit ist in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen folgendes Modell denkbar:

CD83 als Adhäsionsrezeptor auf aktivierten Zellen des Immunsystems bindet an gestresste oder apoptotische Zellen und könnte so z. B. Einfluss auf Antigenpräsentation oder die zellvermittelte Zytotoxizität haben. Durch eine Verstärkung der Bindung zwischen DC und T-Zellen und ihren Zielzellen könnte CD83 so immunstimulatorisch wirken, wie in einigen Veröffentlichungen berichtet wurde (Scholler et al., 2002; Yang et al., 2004). Für das lösliche CD83 wäre folglich denkbar, dass es durch Maskierung des Liganden inhibitorisch wirkt. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass eine transiente Expression von CD83 auch auf der Oberfläche von unreifen DC beschrieben wurde (Klein et al., 2005). Auch für den Thymus wäre die Rolle von CD83 als Adhäsionsrezeptor denkbar, der die für das Lineage Commitment der CD4⁺ Thymozyten essenziellen Interaktionen durch Adhäsion intensiviert. Warum konnte der CD83L nur auf apoptotischen und toten Zellen nachgewiesen werden? Es gibt Hinweise darauf, dass CD83L nach der Bindung an lösliches CD83 internalisiert wird (Scholler et al., 2001) Dieser Vorgang könnte im Zustand der ATP-Depletion im Rahmen von Apoptose und Nekrose zum Erliegen kommen, so dass CD83L dann in der durchflusszytometrischen Analyse detektiert werden konnte. Einen Hinweis darauf gibt auch die Beobachtung, dass die Färbung von CEM-Zellen mit CD83-Fusionsprotein bei 4°C in manchen Experimenten ein intensiveres Signal in der durchflusszytometrischen Analyse ergab,

als die Färbung bei Raumtemperatur. Die energieabhängige Internalisierung des CD83L könnte bei dieser Temperatur zum Erliegen kommen.

Andererseits ist auch die Exposition des Liganden im Rahmen der Apoptose oder Nekrose möglich, wenn er sich im physiologischen Zustand auf der inneren Seite der Zellmembran befindet. Dabei könnte es sich um einen Membranbestandteil, ähnlich wie das Phosphatidylserin handeln oder um ein Protein. Zur Klärung dieser Frage sind jedoch weitere Experimente erforderlich.

6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind potente antigenpräsentierende Zellen und können gegen das jeweilige Antigen entweder eine Immunantwort oder aber für dieses immunologische Toleranz induzieren. Bisher sind hauptsächlich Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht worden, ohne dass schlüssig der Mechanismus der Toleranzinduktion bei unreifen DC und regulatorischen T-Zellen aufgeklärt werden konnte.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Sialylierung von Oberflächenproteinen mit den Lektinen SNL und MAL II, sowie die Spezifität von CD83 als Lektin untersucht. Von Monozyten abgeleitete DC reduzieren im Laufe ihrer Reifung die α 2,6-Sialinsäuredichte auf der Zelloberfläche. Dies geht einher mit der Umstellung von Toleranzinduktion auf Immunstimulation dieser antigenpräsentierenden Zellen.

Darüber hinaus wurden andere wichtige Suppressorzellen in unserem Immunsystem, die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), analysiert. Auch hier wurde eine Zunahme der α 2,6-Sialinsäuredichte auf der Zelloberfläche durch polyklonale Stimulierung gefunden. Da $CD8^+$ T-Zellen inhibitorische Sialinsäure-bindende Rezeptoren exprimieren, kann diesem Phänotyp funktionelle Bedeutung zukommen. Im Gegensatz zu den regulatorischen Zellen zeigten immunomagnetisch aufgereinigte $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen bei Stimulierung eine Verringerung der α 2,6-Sialinsäuredichte. Interessanterweise wurde die Dichte von α 2,6-verknüpfter Sialinsäure auf $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen jedoch nicht verringert, wenn sie zusammen mit $CD4^+$ T-Zellen inkubiert wurden. Dies weist auf die inhibitorische Wirkung der $CD4^+CD25^+$ T_{reg} in dieser Kultur hin. Die Dichte an α 2,3-verknüpfter Sialinsäure blieb unabhängig von den Kulturbedingungen weitgehend gleich. Für die Vermittlung des inhibitorischen Signals, das von der Sialinsäure ausgeht, ist die Rezeptorfamilie der Siglecs (Sialic acid-binding immunoglobuline-like lectins) wichtig. Die meisten der elf Mitglieder, die mit einer Ausnahme auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden, besitzen ein intrazelluläres ITIM-ähnliches Motiv, das ein inhibitorisches Signal generiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Verfahren zur Expression von rekombinanten Siglec-Fusionsproteinen etabliert werden.

Bisher sind DC mit den etablierten Stimulationsverfahren zu ineffektiv, um eine wirksame T-Zellantwort gegen Malignome im Menschen zu generieren. Deshalb wurde begonnen, das Oberflächenprotein CD83 zu analysieren, das reife, aktivierte DC exprimieren. Der Ligand von CD83 ist unbekannt und auch eine ihn exprimierende Zellpopulation konnte bisher aufgrund der niedrigen Affinität des CD83-Moleküls für seinen Liganden nicht eindeutig identifiziert werden. Die extrazelluläre Domäne des humanen CD83-Moleküls wurde kloniert, rekombinant in eukaryotischen 293-Zellen exprimiert und aufgereinigt. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen CD83 und der Siglec-Familie wurde bereits früh angenommen, dass der Ligand ein glykosyliertes Molekül ist. Da die Affinität zwischen Lektinen und ihren glykosylierten Liganden oft sehr gering ist, wurde das CD83-Fusionsprotein tetramerisiert um die Avidität zu erhöhen. Mit diesem Instrument konnte der Ligand auf apoptotischen und nekrotischen Zellen, insbesondere auf Thymozyten und Lymphozyten, nachgewiesen werden. Ein Glycan Array und Versuche mit dem *N*-Glykosylierungshemmer Tunicamycin geben Hinweise darauf, dass es sich beim Liganden von CD83 um ein *N*-glykosyliertes Molekül handelt. Die Ergebnisse des Glycan Array lassen darauf schließen, dass Fucose und Sialinsäure mögliche Bestandteile des Bindungsmotivs sind.

Immunstimulatorische und toleranzinduzierende Zellen des Immunsystems unterscheiden sich deutlich in ihrem Sialylierungsmuster. Das bessere Verständnis der Sialylierung einerseits und Sialinsäure-bindender Rezeptoren andererseits kann dazu beitragen, die Effizienz immuntherapeutischer Verfahren zu steigern.

7 Literatur

- Acosta-Rodriguez, E. V., C. L. Montes, C. C. Motran, E. I. Zuniga, F.-T. Liu, G. A. Rabinovich and A. Gruppi (2004). Galectin-3 Mediates IL-4-Induced Survival and Differentiation of B Cells: Functional Cross-Talk and Implications during *Trypanosoma cruzi* Infection *J Immunol* **172**: 493-502.
- Amado, M., Q. Yan, E. M. Comelli, B. E. Collins and J. C. Paulson (2004). Peanut agglutinin high phenotype of activated CD8+ T cells results from de novo synthesis of CD45 glycans. *J Biol Chem* **279**: 36689-97.
- Angata, T., S. C. Kerr, D. R. Greaves, N. M. Varki, P. R. Crocker and A. Varki (2002). Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *J Biol Chem* **277**: 24466-74.
- Angata, T., S. C. Kerr, D. R. Greaves, N. M. Varki, P. R. Crocker and A. Varki (2002). Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *J Biol Chem* **277**: 24466-74.
- Arrode, G., C. Boccaccio, J. P. Abastado and C. Davrinche (2002). Cross-presentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8+ T cells is regulated by virus-induced, soluble-mediator-dependent maturation of dendritic cells. *J Virol* **76**: 142-50.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* **184**: 387-96.
- Aub, J. C., Sanford, B.H., and Cote, M.N. (1965). Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 396-399.
- Avril, T., H. Floyd, F. Lopez, E. Vivier and P. R. Crocker (2004). The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. *J Immunol* **173**: 6841-9.
- Avril, T., S. D. Freeman, H. Attrill, R. G. Clarke and P. R. Crocker (2005). Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation. *J Biol Chem* **280**: 19843-51.
- Bakker, T. R., C. Piperi, E. A. Davies and P. A. Merwe (2002). Comparison of CD22 binding to native CD45 and synthetic oligosaccharide. *Eur J Immunol* **32**: 1924-32.

- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, K. Palucka, K. A. Palucka, N. Taquet, F. Sanchez-Chapuis and J. C. Gluckman (2000). Immunobiology of dendritic cells
Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Baum, L. G., K. Derbin, N. L. Perillo, T. Wu, M. Pang and C. Uittenbogaart (1996). Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J Biol Chem* **271**: 10793-9.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* **27**: 20-1.
- Blixt, O., B. E. Collins, I. M. van den Nieuwenhof, P. R. Crocker and J. C. Paulson (2003). Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* **278**: 31007-19.
- Boog, C. J., J. J. Neefjes, J. Boes, H. L. Ploegh and C. J. Melief (1989). Specific immune responses restored by alteration in carbohydrate chains of surface molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* **19**: 537-42.
- Boyd, W. C. a. S., E. (1954). Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science* **119**: 419.
- Bradl, M. and R. Hohlfeld (2003). Molecular pathogenesis of neuroinflammation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**: 1364-70.
- Brandley, B. K., S. J. Swiedler and P. W. Robbins (1990). Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell* **63**: 861-3.
- Bresalier, R. S., S. B. Ho, H. L. Schoeppner, Y. S. Kim, M. H. Sleisenger, P. Brodt and J. C. Byrd (1996). Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* **110**: 1354-67.
- Brinkman-Van der Linden, E. C. and A. Varki (2000). New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem* **275**: 8625-32.
- Brix, K., W. Summa, F. Lottspeich and V. Herzog (1998). Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. *J Clin Invest* **102**: 283-93.
- Brockhausen, I., J. Schutzbach and W. Kuhns (1998). Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat (Basel)* **161**: 36-78.

- Brossart, P., A. Schneider, P. Dill, T. Schammann, F. Grunebach, S. Wirths, L. Kanz, H. J. Buhning and W. Brugger (2001). The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* **61**: 6846-50.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **27**: 68-73.
- Cao, W., S. H. Lee and J. Lu (2005). CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J* **385**: 85-93.
- Casabo, L. G., C. Mamalaki, D. Kioussis and R. Zamoyska (1994). T cell activation results in physical modification of the mouse CD8 beta chain. *J Immunol* **152**: 397-404.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**: 2745-52.
- Chen, C. L., W. L. Lee, Y. C. Tsai, C. C. Yuan, H. T. Ng and P. H. Wang (2002). Sialyltransferase family members and cervix squamous cell carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* **23**: 514-8.
- Collins, B. E., O. Blixt, A. R. DeSieno, N. Bovin, J. D. Marth and J. C. Paulson (2004). Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6104-9.
- Connor, R. J., Y. Kawaoka, R. G. Webster and J. C. Paulson (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**: 17-23.
- Cramer, S. O., C. Trumpfheller, U. Mehlhoop, S. More, B. Fleischer and A. von Bonin (2000). Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells. *Int Immunol* **12**: 1347-51.
- Crocker, P. R. and A. Varki (2001). Siglecs in the immune system. *Immunology* **103**: 137-45.
- Crocker, P. R. and A. Varki (2001). Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* **22**: 337-42.
- Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, N. Kutchukhidze and J. J. Lafaille (2004). CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* **173**: 7259-68.

- Curtsinger, J. M., D. C. Lins and M. F. Mescher (1998). CD8⁺ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *J Immunol* **160**: 3236-43.
- Dall'Olio, F., M. Chiricolo, C. Ceccarelli, F. Minni, D. Marrano and D. Santini (2000). Beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase in human colon cancer: contribution of multiple transcripts to regulation of enzyme activity and reactivity with Sambucus nigra agglutinin. *Int J Cancer* **88**: 58-65.
- Daniels, M. A., L. Devine, J. D. Miller, J. M. Moser, A. E. Lukacher, J. D. Altman, P. Kavathas, K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2001). CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity* **15**: 1051-61.
- Daniels, M. A., K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2002). Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol* **3**: 903-10.
- Davey, G. M., S. L. Schober, B. T. Endrizzi, A. K. Dutcher, S. C. Jameson and K. A. Hogquist (1998). Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells. *J Exp Med* **188**: 1867-74.
- de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger and A. Scheffold (2004). Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* **34**: 2480-8.
- Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin and J. W. Dennis (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* **409**: 733-9.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* **193**: 233-8.
- Drexler, H. G., W. G. Dirks, Y. Matsuo and R. A. MacLeod (2003). False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* **17**: 416-26.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* **263**: 9557-60.
- Dudziak, D., F. Nimmerjahn, G. W. Bornkamm and G. Laux (2005). Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation. *J Immunol* **174**: 6672-6.
- Elbein, A. D. (1991). Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. *Faseb J* **5**: 3055-63.
- Figdor, C. G., Y. van Kooyk and G. J. Adema (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* **2**: 77-84.

- Foley, G. E., H. Lazarus, S. Farber, B. G. Uzman, B. A. Boone and R. E. McCarthy (1965). Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia. *Cancer* **18**: 522-9.
- Fontenot, J. D. and A. Y. Rudensky (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* **6**: 331-7.
- Fujimoto, Y., L. Tu, A. S. Miller, C. Bock, M. Fujimoto, C. Doyle, D. A. Steeber and T. F. Tedder (2002). CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell* **108**: 755-67.
- Furtado, G. C., M. A. C. de Lafaille, N. Kutchukhidze and J. J. Lafaille (2002). Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4+ Regulatory T Cell Function. *J. Exp. Med.* **196**: 851-857.
- Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti and R. Gallo (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**: 713-33.
- Galvan, M., K. Murali-Krishna, L. L. Ming, L. Baum and R. Ahmed (1998). Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+ T cells from naive cells. *J Immunol* **161**: 641-8.
- Garcia-Martinez, L. F., M. W. Appleby, K. Staehling-Hampton, D. M. Andrews, Y. Chen, M. McEuen, P. Tang, R. L. Rhinehart, S. Proll, B. Paeper, M. E. Brunkow, A. G. Grandea, III, E. D. Howard, D. E. Walker, P. Charmley, M. Jonas, S. Shaw, J. A. Latham and F. Ramsdell (2004). A Novel Mutation in CD83 Results in the Development of a Unique Population of CD4+ T Cells. *J Immunol* **173**: 2995-3001.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik and W. P. Parks (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-23.
- Gillespie, W., J. C. Paulson, S. Kelm, M. Pang and L. G. Baum (1993). Regulation of alpha 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J Biol Chem* **268**: 3801-4.
- Giuliano, A. E., Irie, R.F., Morton, D.L. and Rammin, K.P. (1978). *Proc. Am. Ass. Cancer Res* **19**: 133.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-82.

- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Grunewald, S., G. Matthijs and J. Jaeken (2002). Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res* **52**: 618-24.
- Hakim, A. A. (1988). A mechanism by which human breast carcinoma cells escape the host immune system. *Neoplasma* **35**: 691-705.
- Hakomori, S. (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10231-3.
- Harduin-Lepers, A., V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien and P. Delannoy (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**: 727-37.
- Harrington, L. E., M. Galvan, L. G. Baum, J. D. Altman and R. Ahmed (2000). Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med* **191**: 1241-6.
- Hock, B. D., L. F. Haring, A. Steinkasserer, K. G. Taylor, W. N. Patton and J. L. McKenzie (2004). The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leukemia Research* **28**: 237-241.
- Hock, B. D., M. Kato, J. L. McKenzie and D. N. Hart (2001). A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol* **13**: 959-67.
- Hoffmann, P., R. Eder, L. A. Kunz-Schughart, R. Andreesen and M. Edinger (2004). Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* **104**: 895-903.
- Hoflack, B. and S. Kornfeld (1985). Lysosomal enzyme binding to mouse P388D1 macrophage membranes lacking the 215-kDa mannose 6-phosphate receptor: evidence for the existence of a second mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4428-32.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**: 1057-61.
- Hori, S., T. Takahashi and S. Sakaguchi (2003). Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* **81**: 331-71.
- Ikehara, Y., S. K. Ikehara and J. C. Paulson (2004). Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9. *J Biol Chem* **279**: 43117-25.
- Imberty, A., C. Gautier, J. Lescar, S. Perez, L. Wyns and R. Loris (2000). An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two Maackia

- amurensis lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J Biol Chem* **275**: 17541-8.
- Iobst, S. T., M. R. Wormald, W. I. Weis, R. A. Dwek and K. Drickamer (1994). Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. *J Biol Chem* **269**: 15505-11.
- Iitzkowitz, S. H., E. J. Bloom, W. A. Kokal, G. Modin, S. Hakomori and Y. S. Kim (1990). Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* **66**: 1960-6.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop and A. H. Enk (2002). Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* **196**: 255-60.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* **193**: 1285-94.
- Kelm, S. (2001). Ligands for siglecs. *Results Probl Cell Differ* **33**: 153-76.
- Kelm, S., J. Gerlach, R. Brossmer, C. P. Danzer and L. Nitschke (2002). The ligand-binding domain of CD22 is needed for inhibition of the B cell receptor signal, as demonstrated by a novel human CD22-specific inhibitor compound. *J Exp Med* **195**: 1207-13.
- Kelm, S. and R. Schauer (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* **175**: 137-240.
- Klein, E., S. Koch, B. Borm, J. Neumann, V. Herzog, N. Koch and T. Bieber (2005). CD83 localization in a recycling compartment of immature human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* **17**: 477-87.
- Knapp, W., P. Dorken and E. P. Rieber (1989). *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, Oxford University Press.
- Knibbs, R. N., I. J. Goldstein, R. M. Ratcliffe and N. Shibuya (1991). Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins. *J Biol Chem* **266**: 83-8.
- Knowles, B. B., C. C. Howe and D. P. Aden (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**: 497-9.
- Koeffler, H. P., R. Billing, A. J. Lysis, R. Sparkes and D. W. Golde (1980). An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood* **56**: 265-73.

- Konishi, A., S. Shimizu, J. Hirota, T. Takao, Y. Fan, Y. Matsuoka, L. Zhang, Y. Yoneda, Y. Fujii, A. I. Skoultchi and Y. Tsujimoto (2003). Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* **114**: 673-88.
- Kotzor, N., M. Lechmann, E. Zinser and A. Steinkasserer (2004). The soluble form of CD83 dramatically changes the cytoskeleton of dendritic cells. *Immunobiology* **209**: 129-40.
- Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber and A. Steinkasserer (2000). Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol* **74**: 7127-36.
- Kuhlman, M., K. Joiner and R. Ezekowitz (1989). The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J. Exp. Med.* **169**: 1733-1745.
- Lagow, E. L. and D. D. Carson (2002). Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem* **86**: 759-72.
- Landolfi, N. F., J. Leone, J. E. Womack and R. G. Cook (1985). Activation of T lymphocytes results in an increase in H-2-encoded neuraminidase. *Immunogenetics* **22**: 159-67.
- Lanoue, A., F. D. Batista, M. Stewart and M. S. Neuberger (2002). Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? *Eur J Immunol* **32**: 348-55.
- Lechmann, M., D. J. Krooshoop, D. Dudziak, E. Kremmer, C. Kuhnt, C. G. Figdor, G. Schuler and A. Steinkasserer (2001). The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med* **194**: 1813-21.
- Levings, M. K., R. Sangregorio and M. G. Roncarolo (2001). Human cd25(+)/cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* **193**: 1295-302.
- Lis, H. and N. Sharon (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev* **98**: 637-674.
- Lock, K., J. Zhang, J. Lu, S. H. Lee and P. R. Crocker (2004). Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* **209**: 199-207.
- Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**: 321-34.
- Mahnke, K., E. Schmitt, L. Bonifaz, A. H. Enk and H. Jonuleit (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**: 477-83.

- Martin, L. T., J. D. Marth, A. Varki and N. M. Varki (2002). Genetically Altered Mice with Different Sialyltransferase Deficiencies Show Tissue-specific Alterations in Sialylation and Sialic Acid 9-O-Acetylation. *J. Biol. Chem.* **277**: 32930-32938.
- McAllister, R. M., J. Melnyk, J. Z. Finkelstein, E. C. Adams, Jr. and M. B. Gardner (1969). Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* **24**: 520-6.
- McKinsey, T. A., Z. Chu, T. F. Tedder and D. W. Ballard (2000). Transcription factor NF-kappaB regulates inducible CD83 gene expression in activated T lymphocytes. *Mol Immunol* **37**: 783-8.
- Metzler, M., A. Gertz, M. Sarkar, H. Schachter, J. W. Schrader and J. D. Marth (1994). Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development. *Embo J* **13**: 2056-65.
- Mukherjee, P., A. R. Ginardi, C. S. Madsen, T. L. Tinder, F. Jacobs, J. Parker, B. Agrawal, B. M. Longenecker and S. J. Gendler (2001). MUC1-specific CTLs are non-functional within a pancreatic tumor microenvironment. *Glycoconj J* **18**: 931-42.
- Müller, I., J. Jenner, R. Handgretinger, J. Riberdy and G. Kerst (2004). Glycosylation and lectins-examples of immunesurveillance and immune evasion. *Histol Histopathol* **19**: 527-33.
- Müller, I., S. M. Pfister, U. Grohs, J. Zweigner, R. Handgretinger, D. Niethammer and G. Bruchelt (2003). Receptor Activator of Nuclear Factor {kappa}B Ligand Plays a Nonredundant Role in Doxorubicin-induced Apoptosis. *Cancer Res* **63**: 1772-1775.
- Munster, D. J., K. P. MacDonald, M. Kato and D. J. Hart (2004). Human T lymphoblasts and activated dendritic cells in the allogeneic mixed leukocyte reaction are susceptible to NK cell-mediated anti-CD83-dependent cytotoxicity. *Int Immunol* **16**: 33-42.
- Murayama, T., C. Zuber, W. K. Seelentag, W. P. Li, W. Kemmner, P. U. Heitz and J. Roth (1997). Colon carcinoma glycoproteins carrying alpha 2,6-linked sialic acid reactive with Sambucus nigra agglutinin are not constitutively expressed in normal human colon mucosa and are distinct from sialyl-Tn antigen. *Int J Cancer* **70**: 575-81.
- Nicoll, G., T. Avril, K. Lock, K. Furukawa, N. Bovin and P. R. Crocker (2003). Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. *Eur J Immunol* **33**: 1642-8.

- Nicoll, G., J. Ni, D. Liu, P. Klenerman, J. Munday, S. Dubock, M.-G. Mattei and P. R. Crocker (1999). Identification and Characterization of a Novel Siglec, Siglec-7, Expressed by Human Natural Killer Cells and Monocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 34089-34095.
- Nishimura, E., T. Sakihama, R. Setoguchi, K. Tanaka and S. Sakaguchi (2004). Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* **16**: 1189-201.
- Nitschke, L., H. Floyd, D. J. Ferguson and P. R. Crocker (1999). Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J Exp Med* **189**: 1513-8.
- Nowell, P. C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. *Cancer Res* **20**: 462-466.
- O'Connor, J. C., J. Julian, S. D. Lim and D. D. Carson (2005). MUC1 expression in human prostate cancer cell lines and primary tumors. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **8**: 36-44.
- Ogata, S., P. J. Maimonis and S. H. Itzkowitz (1992). Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* **52**: 4741-6.
- Ogawa, H., M. Ghazizadeh and T. Araki (1996). Tn and sialyl-Tn antigens as potential prognostic markers in human ovarian carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* **41**: 278-83.
- Ohta, Y., E. Landis, T. Boulay, R. B. Phillips, B. Collet, C. J. Secombes, M. F. Flajnik and J. D. Hansen (2004). Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *J Immunol* **173**: 4553-60.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch and K. Shortman (2003). Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* **101**: 1453-1459.
- Orntoft, T. F. and E. M. Vestergaard (1999). Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* **20**: 362-71.
- Pappu, B. P. and P. A. Shrikant (2004). Alteration of cell surface sialylation regulates antigen-induced naive CD8+ T cell responses. *J Immunol* **173**: 275-84.
- Patel, N., E. C. Brinkman-Van der Linden, S. W. Altmann, K. Gish, S. Balasubramanian, J. C. Timans, D. Peterson, M. P. Bell, J. F. Bazan, A. Varki and R. A. Kastelein (1999). OB-BP1/Siglec-6. a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* **274**: 22729-38.

- Pereira, M. E., E. A. Kabat, R. Lotan and N. Sharon (1976). Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res* **51**: 107-18.
- Piller, F., V. Piller, R. I. Fox and M. Fukuda (1988). Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* **263**: 15146-50.
- Powell, L. D., S. W. Whiteheart and G. W. Hart (1987). Cell surface sialic acid influences tumor cell recognition in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* **139**: 262-70.
- Priatel, J. J., D. Chui, N. Hiraoka, C. J. Simmons, K. B. Richardson, D. M. Page, M. Fukuda, N. M. Varki and J. D. Marth (2000). The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8⁺ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* **12**: 273-83.
- Puck, T. T., S. J. Cieciura and A. Robinson (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* **108**: 945-56.
- Radic, M., T. Marion and M. Monestier (2004). Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J Immunol* **172**: 6692-700.
- Ramakrishnan, V. (1997). Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 83-112.
- Ramsdell, F. (2003). Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* **19**: 165-8.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* **290**: 84-9.
- Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **192**: 295-302.
- Rudd, P. M., T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson and R. A. Dwek (2001). Glycosylation and the immune system. *Science* **291**: 2370-6.
- Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown and S. T. Hwang (1999). Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* **162**: 2472-5.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**: 345-52.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-

- chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**: 1151-64.
- Sata, T., J. Roth, C. Zuber, B. Stamm and P. U. Heitz (1991). Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* lectins. *Am J Pathol* **139**: 1435-48.
- Schneider, U., H. U. Schwenk and G. Bornkamm (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **19**: 621-6.
- Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, A. Dahlin, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom and J. A. Ledbetter (2002). Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol* **168**: 2599-602.
- Scholler, N., M. Hayden-Ledbetter, K. E. Hellstrom, I. Hellstrom and J. A. Ledbetter (2001). CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *J Immunol* **166**: 3865-72.
- Senechal, B., A. M. Boruchov, J. L. Reagan, D. N. Hart and J. W. Young (2004). Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* **103**: 4207-15. Epub 2004 Feb 12.
- Sharon, N. and H. Lis (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**: 53R-62R.
- Shibuya, N., I. J. Goldstein, W. F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters and W. J. Peumans (1987). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* **262**: 1596-601.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida and S. Sakaguchi (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* **3**: 135-42.
- Sordet, O., Q. A. Khan, I. Plo, P. Pourquier, Y. Urasaki, A. Yoshida, S. Antony, G. Kohlhagen, E. Solary, M. Saporbaev, J. Laval and Y. Pommier (2004). Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *J Biol Chem* **279**: 50499-504.
- Spiro, R. G., Q. Zhu, V. Bhojroo and H. D. Soling (1996). Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J Biol Chem* **271**: 11588-94.
- Starr, T. K., M. A. Daniels, M. M. Lucido, S. C. Jameson and K. A. Hogquist (2003). Thymocyte sensitivity and supramolecular activation cluster formation are

- developmentally regulated: a partial role for sialylation. *J Immunol* **171**: 4512-20.
- Stebbins, C. C., C. Watzl, D. D. Billadeau, P. J. Leibson, D. N. Burshtyn and E. O. Long (2003). Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol* **23**: 6291-9.
- Stoolman, L. M. (1989). Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* **56**: 907-10.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-5.
- Taira, S. and H. Nariuchi (1988). Possible role of neuraminidase in activated T cells in the recognition of allogeneic Ia. *J Immunol* **141**: 440-6.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, M. Bi, E. B. Finger, G. Szot, J. Ye, E. L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi and J. A. Bluestone (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* **199**: 1455-65.
- Tang, W., K. Mafune, M. Nakata, T. Konishi, N. Kojima, T. Mizuochi and M. Makuuchi (2003). Association of histochemical expression of Maackia amurensis leucoagglutinin-positive glycoconjugates with behaviour of human gastric cancer. *Histopathology* **42**: 239-45.
- Thomas, J. O. (1999). Histone H1: location and role. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 312-7.
- Thomson, A. W. and L. Lu (1999). Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* **20**: 27-32.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo and E. M. Shevach (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* **172**: 6519-23.
- Tsuboi, S. and M. Fukuda (1997). Branched O-linked oligosaccharides ectopically expressed in transgenic mice reduce primary T-cell immune responses. *Embo J* **16**: 6364-73.
- Tucker, K. A., M. B. Lilly, L. Heck, Jr. and T. A. Rado (1987). Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* **70**: 372-8.
- van den Brandt, J., D. Wang and H. M. Reichardt (2004). Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling. *Mol Endocrinol* **18**: 687-95.
- Varki, A. and T. Angata (2005). Siglecs - the Major Sub-family of I-type Lectins. *Glycobiology*: cwj008.

- Vitale, C., C. Romagnani, A. Puccetti, D. Olive, R. Costello, L. Chiossone, A. Pitto, A. Bacigalupo, L. Moretta and M. C. Mingari (2001). Surface expression and function of p75/AIRM-1 or CD33 in acute myeloid leukemias: engagement of CD33 induces apoptosis of leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5764-9.
- Walker, M. R., D. J. Kasprovicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner and S. F. Ziegler (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest* **112**: 1437-43.
- Wang, F., M. Goto, Y. S. Kim, M. Higashi, K. Imai, E. Sato and S. Yonezawa (2001). Altered GalNAc-alpha-2,6-sialylation compartments for mucin-associated sialyl-Tn antigen in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *J Histochem Cytochem* **49**: 1581-92.
- Wolenski, M., S. O. Cramer, S. Ehrlich, C. Steeg, B. Fleischer and A. von Bonin (2003). Enhanced activation of CD83-positive T cells. *Scand J Immunol* **58**: 306-11.
- Wu, W., P. H. Harley, J. A. Punt, S. O. Sharrow and K. P. Kearse (1996). Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J Exp Med* **184**: 759-64.
- Yamamoto, H., A. Oviedo, C. Sweeley, T. Saito and J. R. Moskal (2001). Alpha2,6-sialylation of cell-surface N-glycans inhibits glioma formation in vivo. *Cancer Res* **61**: 6822-9.
- Yang, S., Y. Yang, J. Raycraft, H. Zhang, S. Kanan, Y. Guo, Z. Ronai, I. Hellstrom and K. E. Hellstrom (2004). Melanoma cells transfected to express CD83 induce antitumor immunity that can be increased by also engaging CD137. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4990-5. Epub 2004 Mar 29.
- Zhang, J. Q., G. Nicoll, C. Jones and P. R. Crocker (2000). Siglec-9, a Novel Sialic Acid Binding Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed Broadly on Human Blood Leukocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 22121-22126.
- Zhou, L., R. Schwarting, H. Smith and T. Tedder (1992). A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* **149**: 735-742.
- Zhou, L. J., R. Schwarting, H. M. Smith and T. F. Tedder (1992). A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* **149**: 735-42.
- Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* **154**: 3821-35.

Zinser, E., M. Lechmann, A. Golka, M. B. Lutz and A. Steinkasserer (2004).
Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by
soluble CD83. *J Exp Med* **200**: 345-51.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Müller I, Jenner J, Riberdy J, Handgretinger R, Niethammer D, Kerst G. Glycosylation and lectins – examples of immunesurveillance and immune evasion. *Histol Histopathol.* 2004 Apr;19(2):527-33

Jenner J, Kerst G, Handgretinger R, Müller I. Increased α 2,6-sialylation of Surface Proteins on Tolerogenic, Immature Dendritic Cells and Regulatory T Cells. *Zur Publikation eingereicht*

Jenner J, Viebahn S, Gieseke F, Alvarez R, Tolosa E, Müller I. CD83 ligand is present on *N*-glycosylated molecule detectable on apoptotic mononuclear cells in human lymph node and thymus. *Manuskript in Vorbereitung*

Publizierte Kongressbeiträge

Müller I, Jenner J, Niethammer D. Differential Regulation of α 2,3- and α 2,6-sialylation during Dendritic Cell Maturation and T Cell Activation. Society for Glycobiology, Annual Meeting, San Diego 2003. *Glycobiology* 13, 887

Jenner J, Dannecker G, Niethammer D, Müller I. Cell Surface Protein Sialylation Changes during Maturation of Dendritic Cells and Activation of T Cells. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin 2003.

Jenner J, Haug M, Schepp C, Dannecker G, Niethammer D, Müller I. Role of Cell Surface Glycoprotein Sialylation in Suppression of Effector Cells by Regulatory T Cells. European Network of Immunology Institutes, Annual Meeting, Ile des Embiez 2003.

Jenner J, Staiber A, Handgretinger R, Niethammer D, Müller I. The DC activation marker CD83 binds to a CD4+ subpopulation of PBMC- options for immune therapy. XVII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede 2004
Klin Padiatr 2004; 216

Viebahn S, Jenner J, Niethammer D, Müller I. Cell surface sialylation of PBMC under physiological and pathological conditions, XVIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede 2005

Danksagungen

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Dr. med. Ingo Müller für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die wissenschaftlich und menschlich ausgezeichnete Betreuung. Er hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und hat durch seine Unterstützung, seine Anregungen und Einfälle maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gernot Bruchelt, der die vorliegende Arbeit stets mit Interesse verfolgt und unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. med. Hansgeorg Probst für seine Bereitschaft, als Mitglied der Fakultät für Chemie und Pharmazie das Gutachten dieser Doktorarbeit zu erstellen.

Dr. Markus Haug und Carsten Schepp für die großartige Unterstützung beim Erlernen vieler neuer Techniken.

Den Kooperationspartnern: Prof. Dr. rer. nat. Richard Alvarez für das Anfertigen des Glycan Array; Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic und seinem Arbeitskreis für die ESI-MS Analyse; Dr. rer. nat. Eva Tolosa für die Kooperation und das Überlassen der Gewebeproben.

PD Dr. rer. nat. Reiner Lammers für das zur Verfügung stellen der Zelllinie 293 und methodische Hilfe beim Erlernen der Transfektion durch Calciumphosphat-präzipitation.

Dr. med. Gunter Kerst, PD Dr. rer. nat. Martin Schenk und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Peter Brossart für das zur Verfügung stellen verschiedener Zelllinien.

Den Kolleginnen und Kollegen aus unserem Labor und den „Nachbarlaboren“ für die freundliche Atmosphäre und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Alexandra Staiber, Sandra Kordowich, Susanne Viebahn, Iris Schwantzer, Henrik Grabner, Friederike Gieseke, Nadine Kemmler und Nina Bergold für die schöne gemeinsame Zeit, für die Spieleabende und natürlich fürs „Schnittchen-Essen“.

Valerie Bahr für den engagierten Einsatz im Rahmen des Graduiertenkollegs und darüber hinaus.

Paavo Bergmann, Eva Limberger und Adelheid Jenner für das „Korrekturlesen“ der Arbeit.

Frank Jenner für technische Unterstützung beim Formatieren der Doktorarbeit.

Meiner WG für die freundschaftliche Unterstützung, insbesondere Jan Prochel für die vielen aufmunternden Abende im Geigerle.

Jochen, der mich auffing und unterstützte, auch wenn das Labor einmal wieder nur Frustration und Fehlschläge zu bieten hatte.

Dem Graduiertenkolleg 794 „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sprecher: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee) und dem fortune-Programm der Universitätsklinik Tübingen für die finanzielle Unterstützung.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten (in alphabetischer Reihenfolge):

Ammon, Bruchelt, Döring, Drews, Gauglitz, Heide, Kovar, Laufer, Lindner, Nagel, Nakel, Pommer, Probst, Rammensee, Safayhi, Schmidt, Schultz, Stevanovic, Wahl, Wankmüller

Tabellarischer Lebenslauf

von Jutta A. Jenner, geb. am 1.10.1976 in Marbach a. N.

1983-1987	Grundschule in Tamm
1987-1990	Friedrich-List-Gymnasium in Asperg
1990-1996	Mörike Gymnasium in Ludwigsburg
1996	Allgemeine Hochschulreife
März 1999	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September 2000	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Nov. 2000-April 2001	Pharmaziepraktikum öffentliche Apotheke, Fortuna-Apotheke, Degerloch
Mai 2001-Okt. 2001	Pharmaziepraktikum in der Apotheke der Universitätsklinik Tübingen
Dezember 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar 2002	Approbation zur Apothekerin
Feb. – Mai 2002	Volontärsarbeit bei der humanitären Hilfsorganisation „Calcutta Rescue“ in Indien
Juli 2002 –Nov. 2005	Anfertigung der Doktorarbeit an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen; bis September 2002 unter Anleitung von Prof. Dr. Günther Dannecker, dann Arbeitsgruppenwechsel durch Weg-Berufung des bisherigen Betreuers; ab 1.10.2002 unter Anleitung von Dr. Ingo Müller und Prof. Dr. Gernot Bruchelt, Mitbetreuung durch Prof. Dr. Hansgeorg Probst. Titel: „Charakterisierung der Oberflächensialylierung von Dendritischen Zellen und T-Zellen in unterschiedlichen Funktionszuständen sowie Untersuchung der Expression und der biochemischen Eigenschaften von CD83-Liganden“ Gefördert wurde die Arbeit durch das Graduiertenkolleg 794 „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ der DFG und durch das Fortüne-Programm der Universitätsklinik Tübingen.