

**Die Rolle der Oberflächensialylierung bei der
Modulation von Immunantworten**

**der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN**

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

von

**Susanne Viebahn
aus Köln
vorgelegte**

D i s s e r t a t i o n

2008

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 2008
Dekan: Prof. Dr. Hanspeter Mallot
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gernot Bruchelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glykosylierung	1
1.1.1	Biosynthese der Glykoproteine	2
1.1.2	Funktionen von Glykoproteinen	5
1.1.3	Sialylierung	6
1.1.4	Ganglioside	6
1.1.5	Immunologische Aspekte der Glykosylierung	7
1.2	Lektine	8
1.3	Siglecs	10
1.3.1	Einteilung	10
1.3.2	Aufbau	12
1.3.3	Vorkommen	12
1.3.4	Liganden	13
1.3.5	Signaltransduktion	14
1.3.6	Funktionen der Siglecs	15
1.4	Immunescape-Mechanismen	17
1.5	Glykosylierung von Tumoren	18
2	Hypothese und Zielsetzung	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	25
3.2	Antikörper und Lektine	29
3.3	Geräte	30
3.4	Verbrauchsmaterialien	31
3.5	Puffer und Lösungen	32
3.6	Bakterienstämme und Nährlösungen	36
3.7	Klonierung der Siglec-Fusionsproteine	37
3.7.1	Plasmidisolierung	39
3.7.2	Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes	39
3.7.3	Restriktionsverdau	39
3.7.4	Analytische Gelelektrophorese	40
3.8	Expression der Siglec-Fusionsproteine	40
3.8.1	Transiente Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation	40
3.8.2	Stabile Transfektion	41
3.8.3	Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie	42
3.8.4	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
3.8.5	Proteinbestimmung	44
3.8.6	Proteinfärbung nach Coomassie	44
3.8.7	Western Blot-Analyse	45
3.8.8	Deglykosylierung mittels PNGase	46
3.8.9	Neuraminidasebehandlung	46
3.8.10	Enzymatische Biotinylierung	46
3.8.11	Oligomerisierung von Siglec-Fusionsproteinen	47
3.9	Aufreinigung von PBMC durch Dichtegradientenzentrifugation	48
3.10	Aktivierung von PBMC	48
3.11	Zelllinien und Zellkultur	48
3.11.1	Mesenchymale, multipotente Stromazellen	51
3.11.2	Zellisolation aus Lymphknoten und Thymusgewebe	51
3.11.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	52
3.12	Durchflusszytometrische Analyse	52
3.13	Aufreinigung von NK-Zellen	53
3.14	Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten	53

Inhaltsverzeichnis

3.15	Generierung antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen.....	54
3.16	IFN γ -ELISpot-Assay	55
3.17	FACS-basierter NK-Zell-Zytotoxizitätsassay	56
3.18	FACS-basierter T-Zell-Zytotoxizitätsassay	57
3.19	Glycanarray.....	57
4	Ergebnisse	61
4.1	Plasmid Design und Klonierung von Siglec-Fusionsproteinen	61
4.2	Oligomerisierung der Siglec-Fusionsproteine.....	63
4.3	Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 werden auf PBMC exprimiert.....	65
4.4	Analyse der B-Zell-Subpopulationen	67
4.5	Expression von Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 auf MNC des Thymus	70
4.6	Expression von Siglec-7 Liganden auf MNC des Lymphknotens	71
4.7	Untersuchung des Glykosylierungsmusters tolerogener Zellen	72
4.7.1	Sialylierung regulatorischer T-Zellen.....	72
4.7.2	Sialylierung Monozyten-abgeleiteter Dendritischer Zellen	73
4.7.3	Glykosylierung Multipotenter mesenchymaler Stromazellen.....	76
4.8	Analyse des Glykosylierungsmusters maligner Zellen	79
4.8.1	Glykosylierungsmuster Leukämischer Zelllinien.....	79
4.8.2	Pädiatrische T-ALL-Blasten exprimieren Liganden für Siglec-7	80
4.8.3	Lösliches Siglec-7 erhöht NK-Zell-Zytotoxizität.....	82
4.8.4	Analyse des Glykosylierungsmusters mittels Glycanarray	86
4.8.5	Durchflusszytometrische Analyse solider Tumoren.....	88
4.8.6	Untersuchung von Neuroblastom-Zelllinien	90
4.8.7	Expression von Siglecs auf PBMC und Einfluss von Zytokinen	95
4.8.8	Glykosylierungsmuster von Mamma- und Ovarial-Carcinomen	96
5	Diskussion	100
5.1	Expression und Oligomerisierung rekombinanter Siglec-Fusionsproteine	100
5.2	PBMC exprimieren Liganden für Siglec-7 und Siglec-9.....	102
5.3	Sialylierungsmuster von Zellen lymphatischer Organe.....	103
5.4	Sialylierung regulatorischer T-Lymphozyten	104
5.5	Sialylierung Monozyten-abgeleiteter Dendritischer Zellen.....	104
5.6	Sialylierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen	106
5.7	Leukämische Zelllinien zeigen unterschiedliche Glyko-sylierungsmuster	107
5.8	Untersuchung des Glykosylierungsmusters mittels Glycanarray.....	108
5.9	Pädiatrische T-ALL-Blasten exprimieren Liganden für Siglec-7	109
5.10	Lösliches Siglec-7 erhöht die NK-Zell-Zytotoxizität	110
5.11	Sialylierung solider Tumoren.....	112
5.12	Sialylierung von Neuroblastomlinien	114
5.13	Expression inhibitorischer Siglecs auf PBMC und Einfluss von Zytokinen	115
5.14	Glykosylierungsmuster von Mamma- und Ovarial-Carcinomen	116
5.15	Bewertung der Versuche und Ausblick.....	117
6	Zusammenfassung.....	119
7	Literatur	121
	Abkürzungen und Synonyme	135
	Publikationen	138

1 Einleitung

1.1 Glykosylierung

Der Prozess der Glykosylierung stellt eine bedeutende posttranslationale Modifikation von Proteinen dar. Mehr als 50% aller menschlichen Proteine sind glykosyliert und 80% aller Zelloberflächenproteine weisen diese Modifikation auf. Glykoproteine sind definiert als Proteine, an die über N- oder O-glykosidische Bindung kovalent Karbohydrate geknüpft sind. Proteine mit N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden bilden den Großteil der Glykoproteine. Bei ihnen wird der Saccharidanteil β -N-glykosidisch an einen Asparagin-Rest in der Aminosäure-Sequenz Asn-X-Ser/Thr (wobei X für alle Aminosäuren außer Prolin und Asparaginsäure steht) des Trägerproteins gebunden.

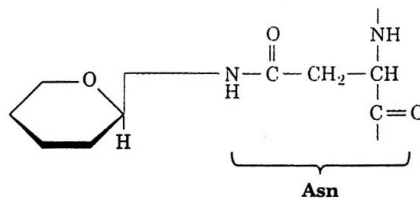


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer N-glykosidischen Bindung. Aus: Stryer et al., 2002.

Diese Modifikation findet bevorzugt an β -Turns oder Loop-Strukturen des Proteins statt, da hier die N-H-Gruppe des Asn eine Wasserstoffbrücke mit dem Hydroxyl-O eines Ser/Thr eingehen kann. Die Glykoproteine enthalten alle eine Core-Struktur, einen Pentasaccharid-Kern, bestehend aus zwei N-Acetylglucosaminen und drei Mannoseresten. N-glykosidisch verknüpfte Glykoproteine weisen meist eine sehr verzweigte Struktur auf, wobei jede Verzweigung negativ geladene Sialinsäurereste als letzten Zucker aufweist. Ausgehend von der Core-Struktur lassen sich drei verschiedene Typen von Glykoproteinen unterscheiden: Glykoproteine des mannosereichen Typs, zu denen z. B. lysosomale Glykoproteine gezählt werden, zeichnen sich durch zwei bis neun zusätzliche Mannosereste aus, die an den Pentasaccharid-Kern gebunden werden. Bei Glykoproteinen des komplexen Typs findet sich eine variable Anzahl verschiedener Core-gebundener Zucker, dazu zählen vor allem N-Acetylgalaktosamin, L-Fucose und Sialinsäuren. Glykoproteine vom Hybridtyp können sowohl mannosereiche als auch komplexe Ketten enthalten.

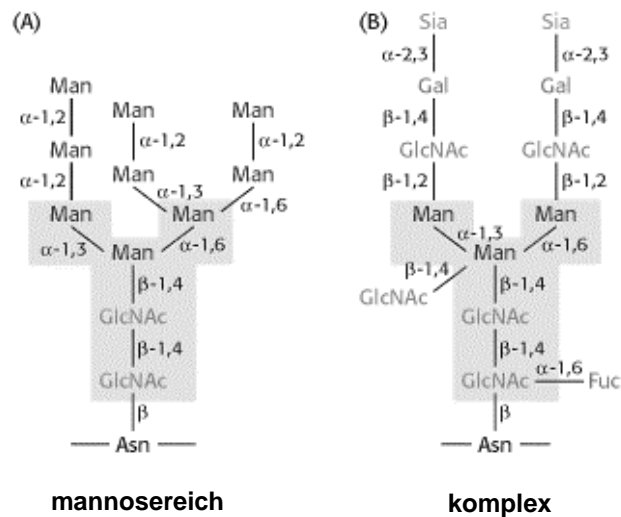


Abb. 1.2: Unterteilung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide in Glykoproteine des (A) mannosereichen oder (B) komplexen Typs. Aus: Stryer et al., 2002.

O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide stellen den weitaus kleineren Teil der Glykoproteine dar. Bei ihnen wird der Saccharidanteil α -O-glykosidisch an einen Serin oder Threonin-Rest (bei Kollagenen an Hydroxylysin-Reste) des Trägerproteins gebunden. Das Kernsaccharid besteht aus β -Galaktose und N-Acetylgalaktosamin.

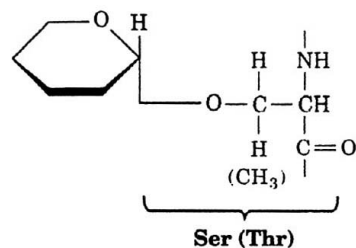


Abb. 1.3: Schematische Darstellung einer O-glykosidischen Bindung. Aus: Stryer et al., 2002.

1.1.1 Biosynthese der Glykoproteine

Die Peptidketten der Glykoproteine werden durch Proteinbiosynthese synthetisiert. Die Kohlenhydratketten dagegen werden ohne eine Beteiligung von Nukleinsäure-Matrizen enzymatisch erzeugt und an den Proteinteil des Glykoproteins angehängt. Die Biosynthese des Kohlenhydratanteils verläuft bei N-glykosidisch verknüpften Glykoproteinen anders als bei O-glykosidisch verknüpften Proteinen in einem zweistufigen, räumlich getrennten Prozeß (Abb. 1.4). Zunächst findet die Core-Glykosylierung im ER statt. N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharide werden hierbei als lipidgekoppelte Vorstufen synthetisiert. Als Anker in der ER-Membran

dient Dolicholphosphat, ein Polyisoprenol aus 14-24 Isopreneinheiten. Das Prinzip der Synthese besteht aus der schrittweisen Addition von Monosaccharideinheiten mit Hilfe von spezifischen Glykosyltransferasen. Diese heften Nukleosiddiphosphat-aktivierte Zucker an einen Akzeptor. Zunächst werden zwei N-Acetylglucosamin- und fünf Mannose-Reste an Dolicholphosphat auf der zytosolischen Seite des ER angehängt, dieser Komplex gelangt über einen Flip-Flop-Mechanismus in das ER-Lumen, wo weitere vier Mannose- und drei Glukose-Einheiten angehängt werden, so dass letztendlich folgende Kernstruktur entsteht: Protein-(NAcGlc)₂-(Man)₉-(Glc)₃. Die gesamte Kernstruktur wird im Folgenden vom Dolicholcarrier auf einen Asparaginrest des naszierenden Polypeptids übertragen. Nicht alle Asn-X-Ser/Thr-Sequenzen werden jedoch glykosyliert. Eine schnelle Faltung des Proteins beispielsweise kann eine Übertragung der Kernstruktur auf einen Asn-Rest unterbinden. Ungefaltete und nicht korrekt gefaltete Proteine werden im Rahmen einer Qualitätskontrolle im ER erkannt und erhalten durch eine Glucosyltransferase einen Glucoserest. So können sie durch die als Chaperon wirkenden Lektine Calnexin und Calreticulin gebunden und im ER zurückgehalten werden. Zu Medikamenten, die in die Synthese N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide eingreifen, gehört beispielsweise das von Streptomyces synthetisierte Antibiotikum Tunicamycin, welches den ersten Schritt der Synthese des zentralen Oligosaccharids blockiert, indem es die Anwesenheit von UDP-N-Acetylglucosamin vortäuscht.

Im Golgi-Apparat erfolgt die Prozessierung des Glykoproteins. Bei diesem Prozess werden O-gekoppelte Oligosaccharide hinzugefügt und Zuckerreste der Kernstruktur modifiziert. Mannosereste werden bis zum Core abgespalten und NAcGlc, Galaktose, Fucose und Sialinsäure angeheftet, so dass eine breite Vielfalt an Glykoproteinen entsteht. O-gekoppelte Oligosaccharide sind meistens sehr kurz. Bei der Biosynthese O-gekoppelter Oligosaccharide werden schrittweise Monosaccharide durch verschiedene Glykosyltransferasen an eine bereits vollständige Polypeptidkette angefügt. Im Gegensatz zur Synthese N-gekoppelter Oligosaccharide findet sich hier keine definierte Aminosäure-Akzeptor-Sequenz, die Glykosylierungsstellen werden durch die Sekundär- und Tertiärstruktur des Polypeptids bestimmt. Die Biosynthese wird durch Anhängen zweier negativ geladener Sialinsäurereste von einem CMP-Vorläufer im trans-Golgi beendet. Die Sortierung der so synthetisierten Proteine erfolgt in den trans-Zisternen des Golgi-

Einleitung

Apparates für den Transport zum jeweiligen Bestimmungsort. Hierbei spielt der Oligosaccharid tragende Anteil eine entscheidende Rolle. Enzyme beispielsweise, die für den Transport zu Lysosomen vorgesehen sind, werden im cis-Golgi an Mannoseresten phosphoryliert und über Bindung an Mannose-6-Phosphatrezeptoren im trans-Golgi zu Lysosomen transportiert.

Eine Ausnahme der beschriebenen Prozesse stellen Galaktose-bindende Proteine (Galektine) dar. Sie werden über einen noch unbekanntem Mechanismus unter Umgehung des Golgi-Apparates in den Extrazellulärraum freigesetzt.

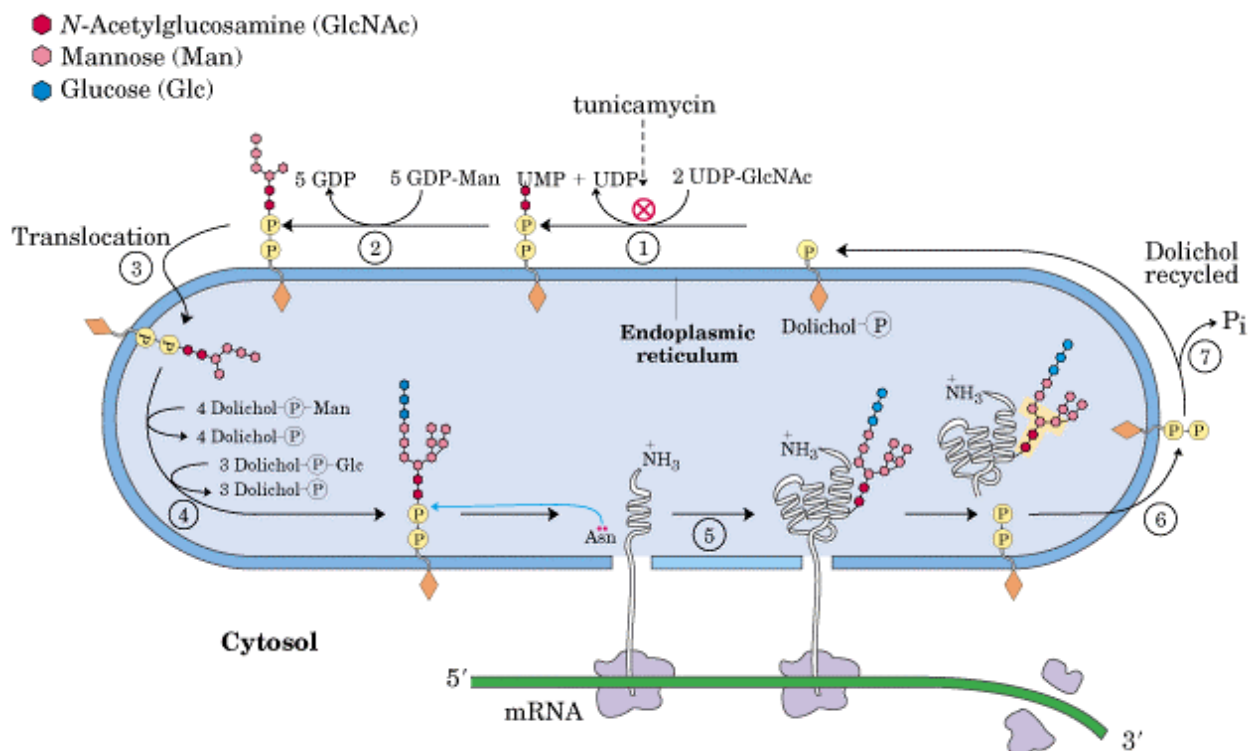


Abb. 1.4: Biosynthese des Kohlenhydratanteils N-glykosidisch verknüpfter Glykoproteine im Endoplasmatischen Retikulum. Das Oligosaccharid wird an Dolichol-Phosphat als Trägermolekül synthetisiert, über eine Translokation in das Lumen des ER gebracht und an den Asn-Rest eines Proteins übertragen. Weitere Modifikationen erfolgen im Golgi-Apparat. Aus: Lehninger et al., 2001.

1.1.2 Funktionen von Glykoproteinen

Glykoproteine weisen eine erhebliche strukturelle und funktionelle Vielfalt auf. So übernehmen sie Aufgaben bei Export und Sekretion, als Membranbestandteile, wobei sich der Kohlenhydratanteil als Glykokalix auf der Aussenseite der Plasmamembran findet und bei der Einschleusung in intrazellulären Kompartimenten. Die meisten zytosolischen und nukleären Proteine mit Ausnahme von Transkriptionsfaktoren sind nicht glykosyliert. Die sehr hydrophilen Kohlenhydrataggregate verändern Polarität und Löslichkeit der Proteine, mit denen sie konjugiert sind. Die Oligosaccharidstruktur dient als Erkennungsstruktur für korrekte Faltung, zielgerichteten Transport, Sortierung und Verteilung der Proteine. Darüber hinaus erhöht die Oligosaccharidstruktur eines Glykoproteins die Stabilität, indem sie durch ihren hohen Raumanpruch und die negative Ladung Proteine vor einem Angriff durch Proteasen schützt. Die Abspaltung von Sialinsäure ist einer der Wege, auf dem der Körper Proteine zum Abbau markiert. Entfernt man beispielsweise experimentell durch Neuraminidase-Behandlung N-Acetylneuraminsäure, so werden die freiliegenden Mannose- und Galaktose-Reste von Asialoglycoprotein-Rezeptoren der Leber erkannt, die Glykoproteine werden aufgenommen und in Lysosomen abgebaut (Schwartz, 1984).

Viele plasmamembranständige Zelladhäsionsmoleküle gehören zu den Glykoproteinen. Hierzu zählen u. a. Cadherine, Mitglieder der Familie der Zell-Adhäsions-Moleküle (CAM), Integrine, Selektine sowie Glykoproteine der ECM wie Laminin und Fibronectin. Auch Proteine der Blutgerinnung wie Thrombospondin und der von Willebrand-Faktor sowie Blutgruppenantigene und Glykophorin in der Erythrozytenplasmamembran sind glykosyliert.

Störungen in der Synthese oder Prozessierung von N-gebundenen Oligosacchariden auf Glykoproteinen führen zu einer Gruppe von Erkrankungen, die als „Congenital disorders of glycosylation“ bezeichnet werden. Zu dieser erstmalig in den 1980er Jahren beschriebenen Gruppe zählen mittlerweile 10 verschiedene Krankheiten, die mit vielfältigen mentalen und organischen Störungen insbesondere von Leber, Niere und Muskel einhergehen und im Kindesalter häufig durch Infektionen letal verlaufen (Grünewald et al., 2002). Diese Krankheitsbilder zeigen die Bedeutung auf, die Glykosylierungsprozessen im Organismus zukommt.

1.1.3 Sialylierung

Im menschlichen Organismus stellen Sialinsäuren die häufigsten terminalen Zucker am nicht-reduzierenden Ende von Oligosacchariden dar. Sialinsäure ist der generische Name für eine Familie von 9-Carbonzuckern, die Derivate der Neuraminsäure sind.

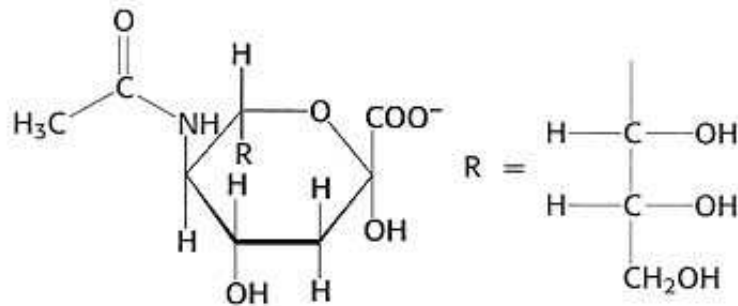


Abb. 1.5: Struktur der Sialinsäure, einem Derivat der Neuraminsäure. Aus: Stryer et al., 2002.

Sialinsäuren weisen eine negative Ladung auf und tragen so zu unterschiedlichen zellulären Funktionen wie dem Transport positiv geladener Substanzen, der Konformation von Glykoproteinen und der Maskierung antigener Determinanten von Rezeptormolekülen bei (Narayanan,1994). Es existieren mehr als 20 verschiedene Sialyltransferasen, die an der Biosynthese von sialylierten Glykoproteinen und Glykolipiden beteiligt sind. Bei Sialyltransferasen handelt es sich um intrazelluläre, an die Membranen des Golgiapparates gebundene Typ II Transmembran Glykoproteine. Sie werden je nach Gewebe, Zelltyp und Entwicklungsstatus unterschiedlich exprimiert, kompetitieren oft um die gleichen Substrate und regulieren so die Sialylierungszustände verschiedener Zellen. Sialyltransferasen katalysieren die Übertragung von Sialinsäureresten in α 2,3-, α 2,6- oder α 2,8-Verknüpfungen an subterminale Zucker. α 2,3-Sialyltransferasen werden zur Synthese von Sialyl-Lewis^a benötigt, in α 2,8-Verknüpfungen finden sich Sialinsäuren bei Gangliosiden oder in Polysialinsäuren, einem linearen α 2,8-Homopolymer, wie z. B. NCAM.

1.1.4 Ganglioside

Eine weitere Gruppe wichtiger im menschlichen Organismus vorkommender Strukturen, deren charakteristischen Kohlenhydratbestandteil N-Acetylneuraminsäure bildet, stellen die Ganglioside dar. Hierbei handelt es sich nicht um Glykoproteine, sondern um Sphingolipide, die ein komplexes Oligosaccharid als polare Kopfgruppe tragen.

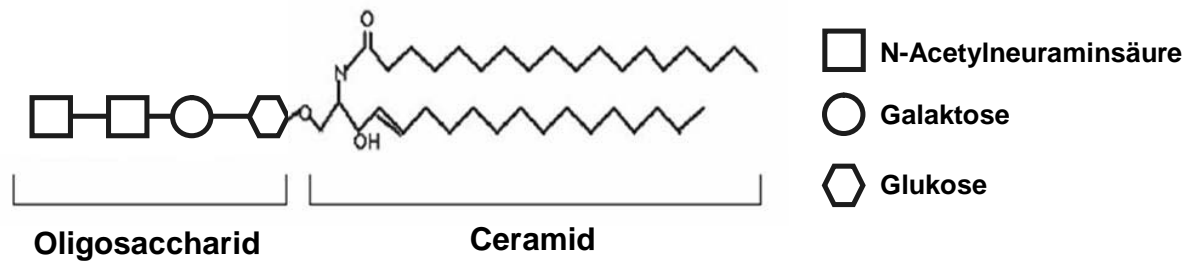


Abb. 1.6: Struktur eines Gangliosids. Beispielhaft dargestellt ist der Aufbau des GD₃-Gangliosids, bestehend aus dem Sphingolipid Ceramid, an das ein komplexes Oligosaccharid als polare Kopfgruppe gebunden ist. Adaptiert nach Yu et al., 2006.

Desialylierte Glykosphingolipide beeinflussen Tumorwachstum, Invasivität und Metastasierung und können Apoptose inhibieren (Kakugawa et al., 2002). Insbesondere die Interaktion von Gangliosiden mit Rezeptortyrosinkinasen beeinflusst das Tumorwachstum (Hakomori, 1996).

Die Sialinsäure-tragenden Ganglioside GD₂ und GD₃ (Abb. 1.6) sind als Tumor-assoziierte Antigene bekannt.

1.1.5 Immunologische Aspekte der Glykosylierung

Bei sehr vielen Schlüsselmolekülen der angeborenen und adaptiven Immunantwort handelt es sich um Glykoproteine.

In der humoralen Immunantwort finden sich Glykoproteine, wie z. B. Immunglobuline und Komplementfaktoren, die an der Erkennung von Pathogenen beteiligt sind. Vakzinierungsstudien haben gezeigt, dass sialylierte Antigene humorale und zelluläre Immunantworten hervorrufen (O'Boyle et al., 1996). Im zellulären Immunsystem kommt Glykoproteinen eine Rolle bei der Proteinfaltung, der Kontrolle korrekt gefalteter Proteine (Calnexin, Calretikulin) und der Beladung von MHC-Molekülen mit Peptiden zu. Oligosaccharide, die u. a. an Glykoproteine des TCR in der immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und APZ gebunden sind, helfen bei der Anordnung, bieten durch ihre Größe Schutz vor Proteasen und unterbinden unspezifische Protein-Protein-Interaktionen (Rudd et al., 1999). Untersuchungen zur Antigenpräsentation im Mausversuch haben ergeben, dass es möglich ist, MHC II-abhängige T-Zellantworten gegen Tumor-assoziierte

Karbohydrate, wie z. B. O- und N-glykosylierte Varianten des murinen Hämoglobin-Decapeptids Hb(67-76), hervorzurufen (Galli-Stampino et al., 1997). Eine genauere Charakterisierung dieser Glykopeptide ist schwierig, da komplexe Glykanstrukturen massenspektrometischen Analysen nur schwer zugänglich sind, konnte aber für einige natürlich prozessierte MHC II-Liganden, die komplexe N-glykosidisch verbundene Glykanseitenketten trugen, bereits durchgeführt werden (Dengjel et al., 2005). Diese Ergebnisse erhöhen die bisher angenommene Anzahl an T-Zellepitopen drastisch.

Sialylierung spielt im Bereich der T-Zell-Entwicklung und Funktion eine große Rolle (Jenner et al., 2006). Es wird vermutet, dass Sialylierungsprozesse während der Lymphozytenreifung im Thymus eine Rolle bei Migrationsprozessen spielen (Baum et al., 1996; Gillespie et al., 1993; Wu et al., 1996). Darüber hinaus ist bei niedrigem Sialylierungsstatus eine erhöhte Sensitivität der T-Zell-Rezeptoren zu beobachten (Curtsinger et al., 1998; Davey et al., 1998), was mit einer veränderten Zusammenlagerung von TCR und seinen Corezeptoren in Verbindung gebracht wird (Daniels et al., 2002). Reife CD8⁺ T-Zellen werden durch Aktivierung, wie sie beispielsweise nach viraler Infektion auftritt, durch Neuraminidasen desialyliert (Galvan et al., 1998; Kaech et al., 2002; Pappu und Shrikant, 2004). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Suszeptibilität von T_H1, T_H2 und T_H17 Zellen gegenüber Galektin-1 vermitteltem Zelltod durch unterschiedliche Glykosylierungsmuster reguliert wird (Toscano et al., 2007).

Eine überschießende T-Zellaktivierung durch Defekte in der Glykosylierung wird im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie experimentell induzierter autoimmuner Encephalomyelitis (EAE) als Modell für Multiple Sklerose, bei rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematoses diskutiert (Demetriou et al., 2001; Parekh et al., 1985; Rudd et al., 1995).

1.2 Lektine

Zur Untersuchung der Glykosylierungsmuster von Zellen werden oftmals Lektine eingesetzt. Als Lektine werden spezifische kohlenhydratbindende Proteine bezeichnet, die sich bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen finden und vielfältige Funktionen erfüllen. Sie weisen alle eine Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (CRD) auf.

Anhand ihrer Bindungseigenschaften werden Lektine in strukturell verwandte Familien eingeteilt (Drickamer,1988). Es lassen sich zellmembranständige-Lektine von löslichen Lektinen unterscheiden. Die größte Gruppe stellen die C-Typ Lektine dar, zu denen die Selektine, Collektine und endozytotischen Lektine zählen (Sharon und Lis,2004; Sharon und Lis,2004). Lektine dieser Gruppe erhielten ihren Namen dadurch, dass sie zur Bindung Calciumionen benötigen. Selektine sind sehr gut charakterisiert. Man unterscheidet zwischen L-, E- und P-Selektinen. L-Selektine werden auf Leukozyten exprimiert und spielen eine Rolle bei der Leukozytenextravasation. Hierbei spielt die Sialylierung und Sulfatierung der Liganden eine große Rolle. E-Selektine finden sich auf Endothelzellen und sind für die Rekrutierung von Leukozyten an Entzündungsorte verantwortlich. P-Selektine auf Thrombozyten und Endothelzellen vermitteln nach Bindung des sialylierten und sulfatierten Liganden PSGL-1 Funktionen bei Prozessen des Granulozyten-Rollings und der Endotheladhäsion sowie der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten (Müller et al., 2004). C-Typ-Lektine sind an der Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd beteiligt. So bilden CD94 und NKG2A einen Killer Inhibitory Receptor Komplex (Carretero et al., 1997), der eine Rolle bei der NK-Zell-Regulierung spielt. Sobald der Rezeptor an nicht-klassisches HLA-E auf der Oberfläche von Zielzellen bindet, wird ein inhibitorisches Signal initiiert, das eine Hemmung der NK-Zell-Zytotoxizität bewirkt (Braud et al., 1998). Virusinfizierte Zellen zeigen eine verringerte Expressionsrate von MHC-I-Proteinen und werden so sensitiver gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität. Darüber hinaus werden die Endozytose-Rezeptoren hepatischer Asialoglykoprotein-Rezeptor, der Mannose-Rezeptor von Makrophagen und das Lektin DEC-205 auf Dendritischen Zellen in diese Familie eingeordnet (Figdor et al., 2002; Müller et al., 2004). Zu den löslichen Lektinen dieser Gruppe zählen das C-reaktive Protein, die Ficoline und Collektine, denen u. a. eine Rolle in der angeborenen Immunantwort zukommt. Neben den Surfactantproteinen A und D der Lunge gehören auch Mannose-bindende Lektine zu dieser Gruppe von Lektinen. Sie erkennen repetitive Strukturen von Mikroorganismen. Eine Bindung resultiert in einer verstärkten Phagozytose und einer Aktivierung von Komplement, das eine Lyse des Pathogens bewirkt. Eine weitere Gruppe bilden die P-Typ Lektine, zu denen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gehören, die für den Transport lysosomaler Enzyme aus dem ER und von der Zelloberfläche verantwortlich sind (Dahms und

Hancock,2002). Daneben existiert die Gruppe der I-Typ-Lektine, die Ig-ähnliche Domänen aufweisen und zu denen NCAM im Nervensystem, PECAM, ICAM-1 und CD48 im Immunsystem sowie die Familie der Siglecs gehören. S-Typ-Lektine wurden so benannt, da sie reduzierte Thiolgruppen zur Bindung benötigen. Sie beinhalten die Familie der Galektine. Galektine sind lösliche, multivalente Rezeptoren für N-Acetyllactosamine, denen vielfältige Aufgaben u. a. bei Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung zukommen. Tab. 1.1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Lektine.

Tab. 1.1: Lektine und die entsprechenden Oligosaccharidstrukturen, die sie erkennen. Modifiziert nach: Weis und Drickamer, 1996.

Lektin	Ligand
Pflanzlich	
Concanavalin A (ConA)	Man α 1-OCH ₃
Wheat germ agglutinin (WGA)	Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,4)Glc GlcNAc(β 1,4)GlcNAc
Sambucus nigra Lektin (SNL)	NeuNAc(α 2,6)Gal NeuNAc(α 2,6)GalNAc
Maackia amurensis Lektin (MAL)	NeuNAc(α 2,3)Gal(β 1,4)GalNAc
Peanut agglutinin (PNA)	Gal(β 1,3)GalNAc
Phytohämagglutinin (PHA)	Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,6)Man(β 1,2)GlcNAc(β 1,4)Gal
Tierisch	
Galektin-1	Gal(β 1,4)Glc
Mannose-bindendes Protein A (MBP-A)	Mannosereiche Oligosaccharide
Viral	
Influenza Virus Hämagglutinin (HA)	Neu5Ac(α 2,6)Gal(β 1,4)Glc
Bakteriell	
Enterotoxin	Gal
Choleratoxin	GM1 Pentasaccharid

1.3 Siglecs

1.3.1 Einteilung

Welche Rolle Sialinsäuren im Immunsystem zukommt, wurde sowohl in Tiermodellen als auch in biochemischen und strukturellen Analysen näher untersucht (Crocker,2002). Sialinsäuren binden an eine Familie von Rezeptoren, die *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins* (Siglecs). Zu dieser Rezeptorfamilie werden 15 Mitglieder gezählt (Angata et al., 2006; Crocker et al., 2007). Auf Grund ihrer

Sequenzähnlichkeit und evolutionär konservierten Strukturen lassen sich Siglecs in zwei Gruppen unterteilen:

- Siglec-1, -2, -4 und -15 zeigen nur 25-30% Sequenzhomologie und weisen Orthologe in allen Säugetieren auf. Siglec-13, das sich bei Primaten findet, ist im menschlichen Organismus nicht mehr zu finden.
- Im Vergleich dazu zeigen die Vertreter der sogenannten CD33-verwandten Siglecs Sequenzhomologien zwischen 50% und 99%. Sie scheinen in der Evolution durch Genduplikation entstanden zu sein (Crocker und Varki,2001) und entwickeln sich durch genomische Evolutionsprozesse wie Exon Shuffling, Exon Verlust und Genkonversion fortlaufend weiter, wie in vergleichenden bioinformatischen Genomuntersuchungen gezeigt werden konnte (Angata,2004). Besonders in der amino-terminalen Ligandenbindungsdomäne findet vermehrt ein Austausch von Aminosäuren statt.

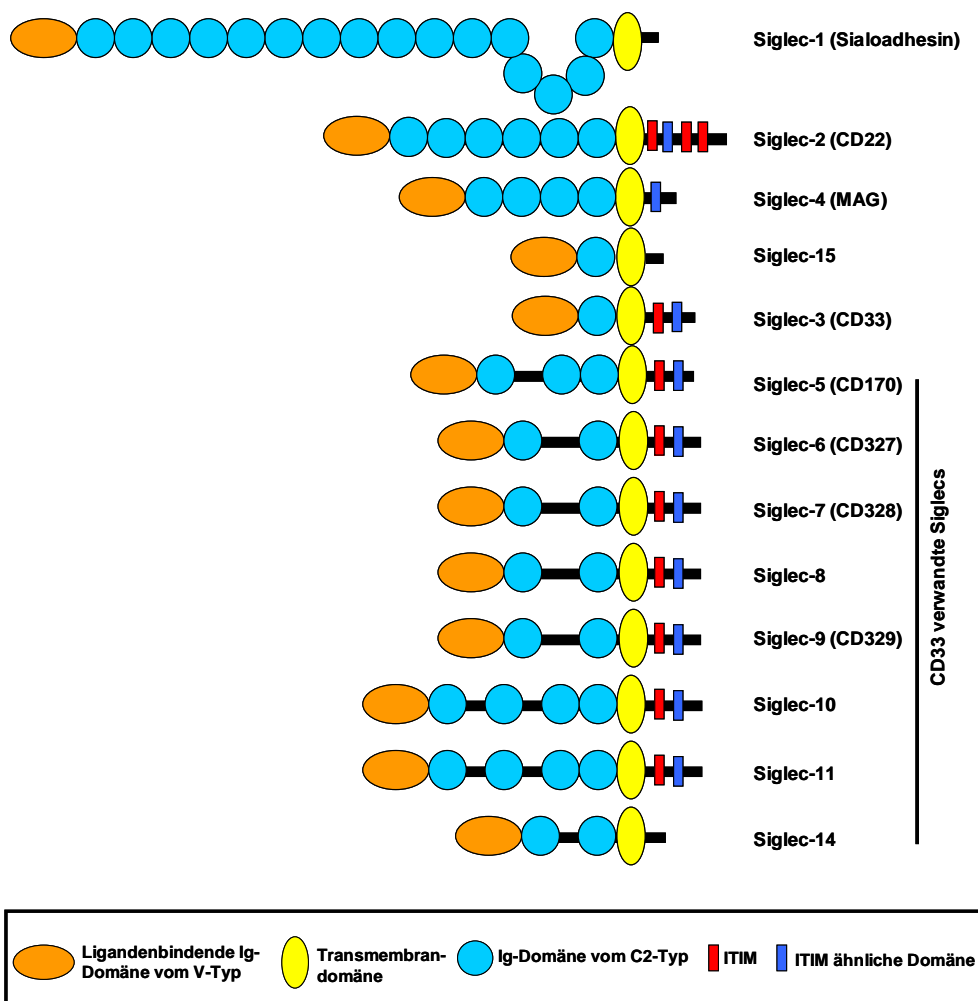


Abb. 1.7: Übersicht über die 15 Vertreter der Siglec-Familie und ihre Struktur.

1.3.2 Aufbau

Siglecs werden von Genen auf Chromosom 19q13.3-4 kodiert. Sie gehören zu den I-Typ Lektinen, da sie Immunglobulin-ähnliche Strukturen aufweisen. Ihr Aufbau ist schematisch in Abb. 1.7 dargestellt. Siglecs sind Typ I Membranproteine. Ihre N-terminale extrazelluläre Domäne besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne vom V-Typ (evolutionäre Ähnlichkeit zur variablen Region der Ig), die für die Ligandenbindung zuständig ist. Daran schließt sich je nach Siglec eine variable Anzahl von Domänen des C2-Typs (evolutionäre Ähnlichkeit zur konstanten Region der Ig) an. Es folgt die Transmembrandomäne und der intrazellulär liegende Carboxyterminus, der bei CD22 und den meisten Vertretern der CD33-verwandten Siglec-Familie ITIM-Sequenzen (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) zur Signaltransduktion enthält.

1.3.3 Vorkommen

Siglecs werden auf humanen Leukozyten exprimiert (Abb. 1.8). Lediglich Siglec-4 findet sich ausschließlich auf Oligodendrogliazellen und Schwannschen Zellen (Crocker und Varki,2001) und Siglec-6 wird auch auf Zellen des Trophoblasten exprimiert (Patel et al., 1999). Bezüglich der Expression auf T-Zellen sind in der Literatur kontroverse Ergebnisse zu finden. Einerseits wird der Verlust von Siglecs auf T-Zellen im Laufe der Evolution postuliert (Nguyen et al., 2006), andererseits eine Expression auf Untergruppen von T-Zellen festgestellt (Ikehara et al., 2004).

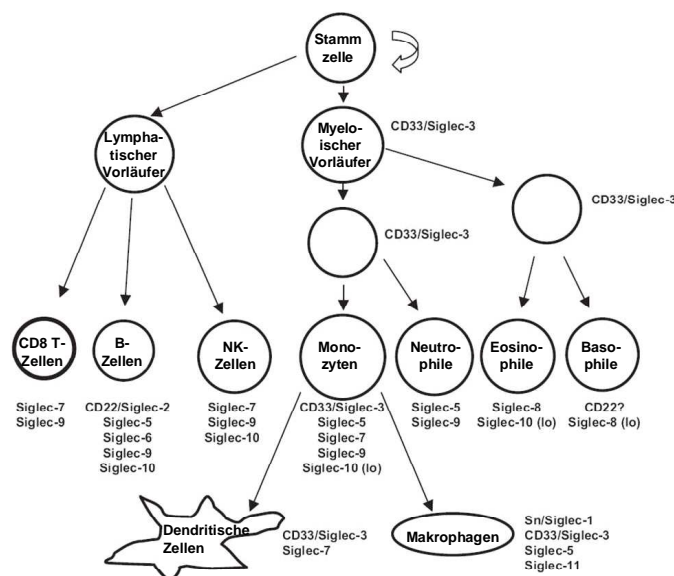


Abb. 1.8: Expression der Siglecs auf Zellen des hämatopoetischen Systems. Nach: Varki und Angata, 2006.

1.3.4 Liganden

Oftmals finden sich Siglecs und ihre Liganden auf der Oberfläche derselben Zelle. Auf ruhenden Zellen gehen die meisten Siglecs cis-Interaktionen mit diesen Sialinsäureliganden ein. Erst nach Aktivierung der Zelle wird diese Maskierung aufgehoben und die Expression von Liganden auf derselben Zelle verringert, so dass Siglecs mit Liganden auf der Oberfläche benachbarter Zellen trans-Interaktionen eingehen können (Freeman et al., 1995). Dennoch wurde gezeigt, dass cis-Interaktionen die Bindung von Liganden in trans zwar verringern, nicht jedoch völlig unterbinden können (Collins et al., 2006). Trotz bestehender cis-Interaktionen können trans-Interaktionen insbesondere mit hochaffinen Liganden, wie sie bei Zell-Zell-Interaktionen oder Zell-Pathogen-Interaktionen vorkommen, stattfinden.

Siglecs erkennen Sialinsäuren, die α 2,3-, α 2,6- oder α 2,8-gebunden an Galaktose (seltener an N-Acetylgalaktosamin) vorliegen. Eine genauere Analyse der Liganden wird dadurch erschwert, dass Lektine zu ihrem Sialoglycan nur eine schwache Affinität aufweisen. Durch Bildung von Rezeptoren- und Ligandenclustern kann jedoch eine hoch-afide, multivalente Interaktion hervorgerufen werden.

Kristallstrukturen von Siglecs und ihren Liganden eröffnen neue Erkenntnisse über die Spezifität der Siglecs (Abb. 1.9). Sialinsäuren binden in eine Tasche der N-terminalen Ig-Domäne der Siglecs. Dabei geht die negativ geladene Carboxylgruppe der Sialinsäure eine Bindung mit einem konservierten Arginin (Arg¹²⁴ bei Siglec-7, Arg¹²⁰ bei Siglec-9) ein (Alphey et al., 2003; May et al., 1998; Zaccai et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die C-C'-Schleife (Reste 70-75 bei Siglec-7) der V-Set Domäne die Spezifität der Siglecs bestimmt und nach Ligandenbindung ihre Konformation ändert (Attrill et al., 2006).

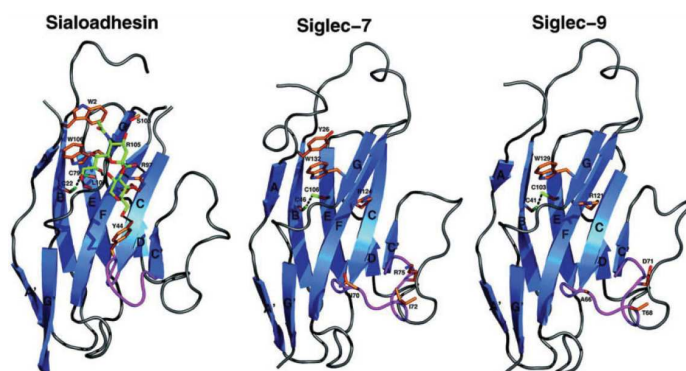

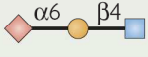


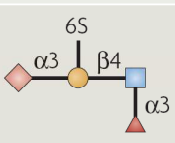
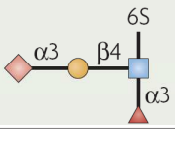


Abb. 1.9: Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomänen von Sialoadhesin (Siglec-1), Siglec-7 und Siglec-9 und gebundener Liganden. Aus: Alphey et al., 2003.

Nähere Untersuchungen erfolgten mit Hilfe von Glykan Arrays (Bochner et al., 2005; Campanero-Rhodes et al., 2006) sowie durch synthetisch hergestellte biotinylierte Sialoside, an die Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Konjugate gebunden waren. Diese Sialoside stellten die wichtigsten Kohlenhydratgruppen von Glykoproteinen und Glykolipiden bei Säugetieren dar (Blixt et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Siglecs bei der Ligandenbindung unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Eine Übersicht gibt Abb. 1.10.

	CD22	Siglec-7	Siglec-8	Siglec-9	Siglec-10
	0	+	+	+	+
	+++	+	+	+	++
	+++	+	+	+	+++
	0	+++	+	0	0
	ND	++	+++	0	0
	ND	+	0	+++	0







 Neu5Ac
 Galactose
 GlcNAc
 Neu5Gc
 Fucose
 S Sulphate

Abb. 1.10: Affinität von Siglecs zu Sialosiden. Aus Crocker et al., 2007.

1.3.5 Signaltransduktion

Die Stärke einer Immunantwort wird durch aktivierende und inhibitorische Signale bestimmt, die eine Aktivierungsschwelle setzen. Die meisten Siglecs weisen ein Membran-nahes ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) und ein ITIM-ähnliches Motiv auf (Patel et al., 1999). Nach Bindung ihres Liganden rufen Siglecs eine inhibitorische Signalkaskade hervor, die durch Rezeptortyrosinkinasen vermittelt wird (Varki und Angata, 2006). Lediglich für Siglec-5 konnte bisher auch eine ITIM-unabhängige Inhibition gezeigt werden (Avril et al., 2005). Die Tyrosinreste der zytoplasmatischen ITIM-Sequenz werden durch Proteintyrosinkinasen der src-Familie phosphoryliert. Dies bewirkt eine Rekrutierung der Phosphatase SHP-1, in manchen Fällen auch SHP-2 (Taylor et al., 1999), die eine src-homology-2

(SH2)-Domäne aufweisen. Als aktivierte Phosphatasen dephosphorylieren sie Substrate relevanter Signalkaskaden und setzen so die Aktivierungsschwelle der Zelle herauf (Avril et al., 2004; Stebbins et al., 2003).

Siglec-7 und Siglec-9 kommt eine Rolle als negativen Regulatoren der T-Zellrezeptor-Signalkaskade zu. Sie hemmen T-Zellen durch eine reduzierte Phosphorylierung der Proteintyrosinkinase ZAP-70 und eine geringere transkriptionelle Aktivität von NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Ikehara et al., 2004). Orr et al. haben kürzlich gezeigt, dass SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) an phosphorylierte ITIMs von CD33 und Siglec-7 binden und als negativer Regulator dieser Siglecs wirken kann (Orr et al., 2007).

Bei Sialoadhesin sowie bei Siglec-14 und Siglec-15 fehlt das ITIM-Motiv. Für Siglec-14 wurde jedoch gezeigt, dass er mit DAP12, einem ITAM-tragenden Adaptor, der sowohl Aktivierung als auch Inhibition vermitteln kann, interagiert (Hamerman et al., 2006).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass der inhibitorische Rezeptor Siglec-5 mit dem möglicherweise aktivierend wirkenden Rezeptor Siglec-14 gepaart ist und auf myeloischen Zellen exprimiert wird. Es ist wahrscheinlich, dass diese beiden Rezeptoren kooperieren und aktivierende sowie inhibitorische Signale durch Bindung von Sialinsäuren hervorrufen. Eine Paarung von Rezeptoren mit aktivierenden und inhibitorischen Signaleigenschaften spielt eine Rolle bei der Feinregulierung von Immunantworten (Angata et al., 2006).

1.3.6 Funktionen der Siglecs

Siglecs vermitteln im Immunsystem sowohl Zell-Zell-Interaktionen als auch Signalfunktionen.

Allgemein spielen CD33-verwandte Siglecs in der Modulation von Leukozyten eine große Rolle. Sie hemmen die Proliferation (Vitale et al., 1999) und zelluläre Aktivierung (Avril et al., 2005). Welche Bedeutung Siglecs bei der Bestimmung der Aktivierungsschwelle von Effektorzellen des Immunsystems zukommt, wurde sowohl für B-Zellen als auch für T-Zellen gezeigt. Siglec-2 (CD22) wird von B-Zellen exprimiert und spielt eine Rolle bei Rezirkulation und Homing von B-Zellen ins Knochenmark, indem es an Liganden auf Sinusoidalepithelialzellen bindet (Nitschke et al., 1999). Darüber hinaus wirkt Siglec-2 als negativer Regulator der B-Zell-

Signaltransduktion (Collins et al., 2006; Kelm et al., 2002; Tedder et al., 2005) sowie als T-Zell-Adhäsionsprotein (Lanoue et al., 2002).

Siglec-7 wird eine Funktion bei der Zellkontakt-abhängigen Zytotoxizität zugeschrieben (Nicoll et al., 1999). NK-Zellen wurden durch Expression von α 2,8-Disialinsäuren als Siglec-7 Liganden in ihrer Funktion inhibiert (Nicoll et al., 2003; Yogeewaran et al., 1981). Dies konnte insbesondere nach Reduktion von cis-Interaktionen zwischen Siglec-7 und Sialinsäuren des Gangliosids GD₃ gezeigt werden (Avril et al., 2006a; Nicoll et al., 2003).

Vernetzung von Siglec-9 bewirkt Apoptose in neutrophilen Granulozyten (von Gunten et al., 2005). Anti-Siglec-8 und anti-Siglec-9 Autoantikörper wurden in intravenösen Ig-Präparationen nachgewiesen (von Gunten et al., 2007). Diese Präparationen werden zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien eingesetzt. Natürliche Autoantikörper sollen dabei anti-inflammatorische Effekte, wie z. B. Zerstörung von eosinophilen Granulozyten, vermitteln. Anti-inflammatorische Eigenschaften von IgG werden dabei durch Sialylierung des Fc-Teils hervorgerufen (Kaneko et al., 2006). Diese Autoantikörper bewirkten Autophagie-ähnlichen Zelltod von neutrophilen Granulozyten und könnten eine Erklärung liefern für Neutropenien, die oftmals bei Therapien mit intravenösen Ig-Präparationen beobachtet werden.

Darüber hinaus scheinen Siglecs an der Endozytose von sialylierten Pathogenen beteiligt zu sein. Mittlerweile sind mehr als 20 pathogene Mikroorganismen bekannt, die Sialinsäuren ihres Wirtes in ihre Glykoproteine einbauen, um über molekulare Mimikry einer Immunantwort zu entgehen (Vimr et al., 2004) (Tab. 1.2). Sialoadhesin und einige CD33-verwandte Siglecs können mit Sialinsäuren auf Pathogenen wie *C. jejuni*, *Trypanosoma cruzi* oder *B Streptokokken* interagieren. Dies bewirkt eine Inaktivierung des Pathogens und eine Präsentation der Antigene. Auch wird eine Inhibition der Effektorzellen durch Interaktionen zwischen Siglec-tragenden Effektorzellen und Liganden diskutiert, die den Erreger vor Entzündungs- und Immunantworten schützen könnte (Avril et al., 2006b; Carlin et al., 2007; Monteiro et al., 2005).

Tab. 1.2: Sialinsäure-exprimierende Pathogene. Dargestellt sind Pathogene mit ihren Liganden und den entsprechenden Siglecs, von denen sie im Wirtsorganismus erkannt werden. Adaptiert aus: Crocker et al., 2007; Vimr et al., 2004.

Pathogen	Ligand	Siglec im Wirt	Effekt
Neisseria meningitidis	Neu5Ac α 2-3Gal in Lipo-Oligosacchariden	Siglec-1, Siglec-5	verstärkte Pathogenaufnahme durch Makrophagen
Campylobacter jejuni	Neu5Ac α 2-8 Neu5Ac α 2-3Gal in Lipo-Oligosacchariden	Siglec-7	verstärkte Bindung der Pathogene an NK-Zellen und Monozyten
Trypanosoma cruzi	Neu5Ac α 2-3Gal in Mucinen	Siglec-1	verstärkte Pathogenaufnahme durch Makrophagen
B Streptokokken	Neu5Ac α 2-3Gal in Polysacchariden	multiple CD33-verwandte Siglecs	unbekannt

1.4 Immunescape-Mechanismen

Maligne Zellen werden im Rahmen des als Immune Surveillance bekannten Prozesses von Effektorzellen des Immunsystems erkannt und rufen Immunantworten hervor. Viele Patienten zeigen spontane Bildung von Immuneffektor-Zellen oder Antikörpern gegen Tumorantigene. T-Zellen aus Tumorpatienten zeigen inhibitorische Wirkung (Wolf et al., 2003). Trotz dieser Immunüberwachung kann es in immunkompetenten Individuen zur Tumorbildung kommen. Besonders nach Immunisierung von Patienten gegen Tumorantigene werden infiltrierende T-Zellen in Tumoren gefunden. Diese attackieren aber den Tumor nicht und zeigen oft eine gestörte antigen-spezifische, zytolytische Aktivität (Brossart et al., 2001; da-Nagai et al., 2000; Gajewski et al., 2006; Guilloux et al., 1994; Mukherjee et al., 2001; Mulder et al., 1996). Mögliche Ursachen hierfür werden in Mechanismen des Tumors gesehen, einer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Diese Immunescape-Mechanismen beinhalten u. a. Toleranzinduktion (Overwijk, 2005; Willmsky und Blankenstein, 2005), Herunterregulation der T-Zell-Rezeptor

Signaltransduktion, Apoptoseresistenz, verminderte Antwort auf IFN γ und Enzyme wie Indolamin 2,3-Dioxygenase (Gajewski et al., 2006) und eine ungenügende Immunstimulation durch DCs. Eine ungenügende Anzahl und eine zu geringe Avidität der T-Zellen sowie Probleme beim Durchdringen des Tumorstromas werden diskutiert (Rosenberg,2001). Auch wurden Defekte in der Antigenpräsentation beobachtet, so z. B. Defekte bei Proteasomkomponenten, TAP1 und TAP2, β -Mikroglobulin oder eine Herunterregulierung von MHC I. Freisetzung von löslichen Faktoren wie TGF- β , Fas, Fas-Ligand, MHC I-ähnlichen Kette A-Molekülen (MICA) und Sekretion immunsuppressiver Zytokine ermöglicht es Tumoren, Immunantworten durch CTL und NK Zellen zu unterbinden (Khong und Restifo,2002) (Abb. 1.11).

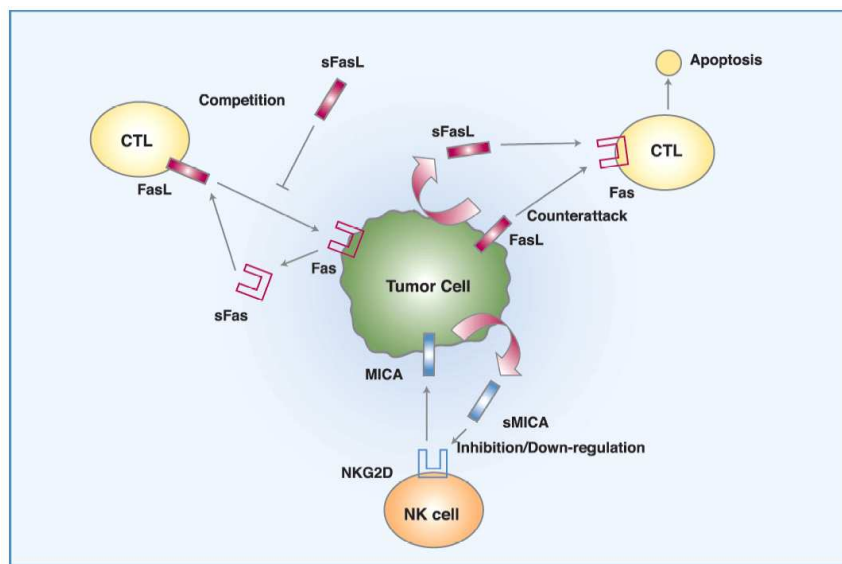


Abb. 1.11: Strategien des Immune Escape: Tumoren setzen lösliche, kompetitierende Faktoren wie Fas, Fas-Ligand (FasL) und MICA frei, um durch CTL und NK-Zellen vermitteltem Zelltod zu entgehen. Adaptiert aus: Kim et al., 2006.

1.5 Glykosylierung von Tumoren

Welche Rolle Glykosylierungsprozessen beim Immune Escape von Tumoren zukommt, ist noch nicht geklärt. Veränderungen im Glykosylierungsmuster finden sich bei fast allen Krebserkrankungen. Bei vielen Tumor-assoziierten Antigenen handelt es sich um Glykan-Epitope (Hakomori,2002).

Erste Erkenntnisse über das Glykosylierungsmuster von Tumorzellen erhielt man durch die Beobachtung, dass Tumoren verstärkt pflanzliche Lektine binden (Raedler und Schreiber, 1988).

Die Überexpression spezifischer Glykosyltransferasen bewirkt die Bildung von Tumorglykanen. GlcNAc Transferase V wurde als eines der ersten Onkogene identifiziert (Yoshimura et al., 1995). Das Enzym katalysiert die α 1,6-Verzweigung von N-glykosidisch gebundenen Glykanen, die bei Tumoren verstärkt ist. Durch Transfektion des Enzyms in nicht maligne Zellen konnte eine maligne Transformation hervorgerufen werden, die sich im Verlust der Kontaktinhibition, Wachstum in Softagar und Metastasenbildung äußerte.

Untersuchungen zeigen, dass veränderte Glykosylierungsmuster das Ergebnis initialer onkogener Transformation sind und Prozesse wie Proliferation, Invasion, Angiogenese und Metastasierung beeinflussen (Hakomori, 2002). Glykane sind an der Tumorpromotion beteiligt. N-Glykane wie β 6GlcNAc-Verzweigungen spielen eine Rolle bei der Tumorinvasion, indem sie die E-Cadherin abhängige Tumoradhäsion verändern (Yoshimura et al., 1996). Auf Tumoren findet sich eine Zunahme der Sialinsäuredichte (Bresalier et al., 1996). Veränderte O-Glykane vom Mucintyp wie das T-Ag, das Tn-Ag und ihre sialylierten Formen wurden im Rahmen der Tumorigenese beschrieben (Singhal et al., 1991; Springer, 1995) und beeinflussen Prozesse wie Proliferation, Überlebensrate, die Fähigkeit zur Invasion sowie die Interaktion mit Lektinen und Zelloberflächenrezeptoren auf Zellen des Immunsystems (Blottiere et al., 1992; Crocker, 2005; Gerloni et al., 2005; Varki und Angata, 2006). Sialyl-Tn sowie Sialyl-Le^x, Sialyl-Le^a und Le^y spielen als Selektinliganden eine Rolle bei der Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen (Fuster und Esko, 2005; Narayanan, 1994; Nemoto-Sasaki et al., 2001). Darüber hinaus bewirkt die negative Ladung der Sialinsäuren durch Abstoßung eine Lösung der Tumorzellen von der Tumormasse. Durch Interaktionen von Sialinsäuren mit basischen Resten von Matrixproteinen wie Laminin oder Fibronectin werden Invasionsprozesse der Tumorzellen erleichtert. Polysialinsäuren, die auf dem Adhäsionsmolekül NCAM bei Neuroblastomen exprimiert werden, interagieren mit Signalwegen der Zelle und beeinflussen Proliferations- und Differenzierungsprozesse (Seidenfaden et al., 2003). Glykoproteine und Glykosphingolipide aktivieren Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinasen, Proteoglykane dienen als Co-Rezeptoren für lösliche Wachstumsfaktoren des Tumors und steigern so die Proliferation des Tumors. Die

Freisetzung von Gangliosiden in die Blutbahn greift in die Immunantwort gegen Tumoren ein. Die Ganglioside GM₁, GM₃, GD₂ und GD₃ werden mit Tumorwachstum in Verbindung gebracht. Sezernierte Heparan-Sulfat-Proteoglykane der ECM speichern Wachstumsfaktoren, die durch Tumorheparanasen freigesetzt werden können und auch bei Prozessen der Angiogenese eine Rolle spielen (Fuster und Esko,2005).

Wenig ist bisher über die Mechanismen bekannt, über die Tumorglykane das Immunsystem beeinflussen. Eine direkte Interaktion von glykosylierten Liganden auf der Oberfläche maligner Zellen mit inhibitorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von CTLs und NK-Zellen, die das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen zugunsten einer Inhibition verschiebt, wird diskutiert (Agrawal et al., 1998; Sinclair,2000).

Veränderungen im Glykosylierungsmuster einiger Tumoren sind bereits näher untersucht worden. So sind Colonicarcinome bezüglich ihrer Glykosylierung gut charakterisiert. Sie weisen besonders Veränderungen in der Sialinsäuredichte auf. In einer Studie fand sich α 2,6-gebundene Sialinsäure auf 23 von 26 Colonicarcinomproben, jedoch auf keiner Probe gesunden Colongewebes (Agrawal et al., 1998; Dall'Olio und Trere,1993; Sata et al., 1991). Tn- und STn-Antigene sind Marker für Adenocarcinome und werden mit erhöhter Invasivität, Proliferation, Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert (Agrawal et al., 1998; Dall'Olio und Chiricolo,2001; Hanski et al., 1996; Ito et al., 1997; Itzkowitz et al., 1990; Petretti et al., 1999). Die entsprechenden Sialyltransferasen werden verstärkt exprimiert (Kudo et al., 1998). Expression von Sialyl-Lewis^x-Epitopen auf Colonicarcinomen geht mit einer schlechteren Überlebensrate einher (Nakamori et al., 1993). Da diese Strukturen Liganden für Selektine darstellen, ist es wahrscheinlich, dass sie zur Tumordinvasion und Metastasierung beitragen (Kojima et al., 1992). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass durch das RAS-Onkogen, das in 50% aller Colon-Adenocarcinome zu finden ist, ST6Gal-I hochreguliert und dadurch die α 2,6-Sialylierung von β 1 Integrin Adhäsionsrezeptoren auf Epithelzellen des Colons erhöht wird. Hierdurch werden Bindungen an ECM-Komponenten verstärkt und eine verstärkte Tumormigration ermöglicht (Seales et al., 2005). Darüber hinaus ist die Sialidase Neu3, die Ganglioside hydrolysiert, in Colonicarcinomzellen hochreguliert. Dies bewirkt eine Hemmung der Apoptose (Kakugawa et al., 2002). Dall'Olio et al. haben gezeigt, dass α 2,6-Sialinsäuren keinen Einfluß auf das Killing von

Coloncarcinom-Zellen durch NK-Zellen haben (Dall'Olio et al., 1997). Andere Gruppen betonen jedoch, dass Sialylierung mit einer erhöhten Resistenz gegenüber NK-Zell vermittelter Lyse einhergeht (Nicoll et al., 2003; Yogeewaran et al., 1981). Siglec-7 bindet an das auf nonmalignen Colonepithelzellen exprimierte Disialyl-Lewis^a-Antigen nicht aber an Sialyl-Lewis^a auf Coloncarcinomzellen (Miyazaki et al., 2004). Ein daraus resultierender Verlust normaler Zell-Zell-Erkennung zwischen Mukosaepithel und Lymphozyten wird diskutiert.

Bei Brustkrebserkrankungen korreliert eine veränderte Glykosylierung mit dem Grad der Malignität. Auf Mamma-Carcinomzellen finden sich neben dem STn-Antigen (Sewell et al., 2006) hochmolekulare Karbohydratstrukturen, die verstärkt sialyliert und fucosyliert sind (Hakim, 1988).

Zu Tumor-assoziierten Antigenen, die bei Brustkrebs oft überexprimiert werden, zählen HER-2/neu (ERBB2), Antigene der MAGE-Familie und MUC-1. Insbesondere die Funktion des Wachstumsfaktorrezeptors ERBB2 wird durch Interaktionen mit Glykanen wie dem Gangliosid GM₁ oder dem Mucin MUC4 (Hollingsworth und Swanson, 2004) beeinflusst.

Bezüglich der Glykosylierung von Neuroblastomen ist bekannt, dass Ganglioside verstärkt auf Neuroblastomen exprimiert werden. Gangliosid GM₁ interagiert mit Galectin-1 (Kopitz et al., 1998). Das Gangliosid GD₂, welches verstärkt in Tumorgewebe und Serum von Neuroblastompatienten detektiert wurde (Cheung et al., 1985; Schulz et al., 1984), wurde als Ziel für Antikörper-vermittelte, immunotherapeutische Ansätze bei Patienten mit Neuroblastomen eingesetzt (Otto et al., 2005; Simon et al., 2004).

Untersuchungen bezüglich der Glykosylierung von leukämischen Zellen ergaben, dass eine veränderte Sialylierung mit verstärkter Proliferation von Lymphoblasten bei ALL korreliert (Ghosh et al., 2007). Die akute lymphatische Leukämie (ALL) stellt mit 80% die überwiegende pädiatrische Leukämieform dar. Durch Immunophänotypisierung, zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen erfolgt eine weitere Unterteilung in die entarteten B- und T-Zellreihen Pro-B-ALL, common-ALL (cALL), prä-B-ALL sowie B-ALL und T-ALL. Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist in 90-95% der Patienten durch das Philadelphiachromosom [t(9;22) (q34;q11)], das im Fusionsonkogen der aktiven Tyrosinkinasen Bcr-Abl resultiert, gekennzeichnet. Das Tyrosinkinase-Fusionsprotein Bcr/Abl kontrolliert die Expression von NKG2D Rezeptor Liganden und des Gangliosids GM₁. Der

therapeutisch eingesetzte Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib beeinflusst die Oberflächenglykosylierung dieser Zellen und verändert so die Bindung an den NK-Zell-Rezeptor NKG2D und die zytolytische Aktivität (Cebo et al., 2006). Eine Quervernetzung von Siglec-7 oder Siglec-3 führt bei chronisch-myeloischer Leukämie zu einer Inhibition der Zellproliferation (Vitale et al., 2001).

2 Hypothese und Zielsetzung

Veränderungen im Glykosylierungsmuster von Zell-Oberflächenproteinen finden sich häufig bei maligner Transformation. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit Veränderungen in der Oberflächensialylierung Immunantworten modulieren und so zu Prozessen der Immunevasion von Tumoren beitragen können.

Sialinsäuren stellen das häufigste, terminale Karbohydrat in humanen Glykanen dar. Untersuchungen dieser Arbeit konzentrieren sich auf eine Familie von Sialinsäure bindenden Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (Siglecs). Die meisten Mitglieder dieser Familie werden auf humanen Leukozyten exprimiert und vermitteln inhibitorische Signale nach Bindung ihrer Liganden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von inhibitorischen Rezeptoren aus der Familie der Siglecs entscheidend an der Vermittlung von Toleranz beteiligt ist.

Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass Sialoglykane auf der Oberfläche maligner Zellen Liganden für Siglecs darstellen und so an einer Inhibition von attackierenden Effektorzellen beteiligt sind. Dies würde es Tumoren ermöglichen, einer Immunantwort zu entgehen.

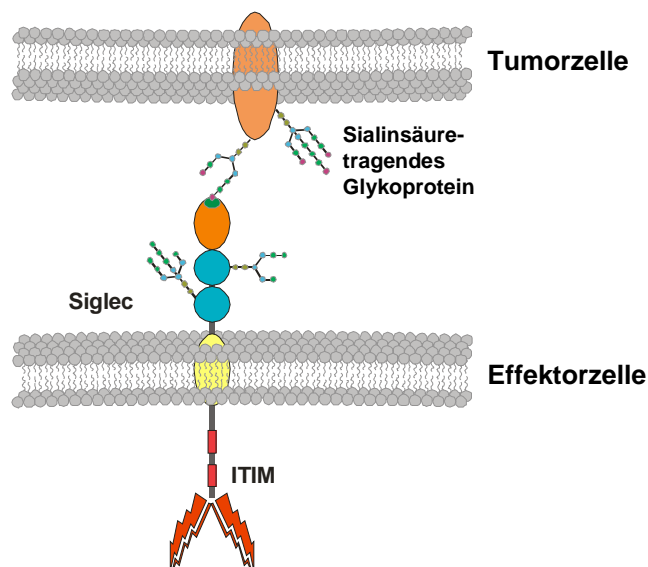


Abb. 2.1: Modell der Arbeitshypothese. Tumorzellen exprimieren Sialinsäure-konjugierte Oberflächenproteine, die Liganden für inhibitorische Rezeptoren aus der Familie der Siglecs darstellen. Nach Bindung der Sialinsäure-Reste an Siglecs auf der Oberfläche von Effektorzellen, wird ein inhibitorisches Signal generiert, das die Effektorzelle in ihrer Aktivität hemmt.

Das Aufgabengebiet dieser Arbeit beinhaltet:

1. Rekombinante Expression von Siglec-7 und Siglec-9
2. Detaillierte Siglec-Ligandenanalyse mit Glykan Arrays
3. Analyse der Siglec-Ligandenexpression im Immunsystem und auf pädiatrischen Malignomen
4. Funktionelle Untersuchung der Rolle von Siglecs in Konkurrenzexperimenten

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole)-Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin (Na-Salz)	Roth, Karlsruhe
anti-CD4 MACS MicroBeads (keine Angaben zum Klon)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD8 MACS MicroBeads (Klon BW135/80)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD14 MACS MicroBeads (keine Angaben zum Klon)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD56 MACS MicroBeads (keine Angaben zum Klon)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-PE MACS MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>N,N</i> -Bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure (BES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin
Biotin-Protein-Ligase BIRA500 [1 mg/ml], Biomix A und B	Avidity, Denver, CO
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA, Fraktion V, mind. 98%, proteasefrei	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
3-(Cyclohexylamin)-propan-1-sulfonsäure (CAPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg} Isolierungskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Complete Mini EDTA-free, Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Cambrex, Verviers, Belgien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Essigsäure p. a.	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Flow®	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötale Kälber Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fortecortin 4 mg/ml (INN: Dexamethason)	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Gel Extraktion Purification Kit	Qiagen, Hilden
Glycin	Merck, Darmstadt
Granulozyten-Makrophagen- koloniestimulierender-Faktor (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
6x His Protein Ladder	Qiagen, Hilden
Humanes Serum Albumin	Centeon Pharma GmbH, Marburg; jetzt Aventis Behring, Marburg
Interferon- γ (IFN- γ), human	R&D Systems, Minneapolis, MN
Interleukin-1 β (IL-1 β), human	R&D Systems, Minneapolis, MN
Interleukin-2 (IL-2), human	R&D Systems, Minneapolis, MN
Interleukin-4 (IL-4), human	R&D Systems, Minneapolis, MN
Interleukin-6 (IL-6), human	R&D Systems, Minneapolis, MN
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Luria-Bertani (LB) Broth Medium	LAB M, Lancashire, England
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Loading Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Lysepuffer	Universitätsapotheke Tübingen
Methanol	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Micro BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL
MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA
Na-Pyruvat (100 mM)	Biochrom, Berlin
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH (1 M)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (Na-SDS)	Serva, Heidelberg
Neuraminidase α2-3, -6, -8 (Vibrio cholerae)	Calbiochem, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren (100 mM)	Biochrom, Berlin
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
NK cell isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
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 (10000 IE/10000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
PeqGOLD High Range DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
PeqGold Protein Marker	Peqlab, Erlangen
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PNGase F, Nonidet®P-40 (NP-40), G7 Puffer	New England BioLabs, Ipswich, MA
Polyglobin (humane Immunglobuline)	Bayer, Leverkusen
Propidiumiodid	BD Pharmingen, Heidelberg
Prostaglandin E ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qproteome Glycoprofiling Field-Test Kit	Qiagen, Hilden
Rainbow coloured molecular weight marker (Rainbow marker)	Amersham, Freiburg

Material und Methoden

Restriktionsenzym Bgl II (10000 U/ml), NEB-Puffer 3	New England Biolab, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym Hind III (20000 U/ml), NEB-Puffer 2	New England Biolab, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym Xba I (20000 U/ml), NEB-Puffer 2	New England Biolab, Frankfurt/Main
RPMI 1640 mit Phenolrot	Biochrom, Berlin
Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat (SA-HRP)	Amersham, Freiburg
Streptavidin R-Phycoerythrin Konjugat (SA-PE)	Molecular Probes, Eugene, OR
N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) Biotin	Pierce, Rockford, IL
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution, Stable Peroxidase Solution	Pierce, Rockford, IL
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), human	R&D Systems, Minneapolis, MN
Tris-Base	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% (w/v) in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom, Berlin
Trypsin, 2,5%	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Tunicamycin (50 mg/ml)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame
X-Vivo 20 Medium	Bio Whittacker, Verviers, Belgien
Zeocin (100 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, CA

3.2 Antikörper und Lektine

Murine anti-human Antikörper:

Maus IgG _{1,κ} -FITC/PE/APC (Isotypkontrolle)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD3-FITC/PE (Klon Sk-7)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD4-FITC/PE/APC (Klon RPA-T4)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD5-FITC (Klon L17F12)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD8-FITC/PE/APC (Klon SK1)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD10-FITC (Klon W8E7)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD10-PE (Klon ALB1)	Immunotech (Beckman Coulter, Fullerton, CA)
anti-CD14-FITC/PE (Klon MφP9)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD15-FITC (Klon HI98)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD19-FITC/PE (Klon HIB19)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD19-APC (Klon LT19)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD25-FITC/APC (Klon M-A251)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD27-FITC (Klon L128)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD38-FITC (Klon HIT2)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD56-FITC (Klon B159)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD69-FITC (Klon FN50)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD83-FITC (Klon HB15A)	Immunotech (Beckman Coulter, Fullerton, CA)
anti-CD86-FITC (Klon 2331 (FUN-1))	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD138-FITC (Klon MI15)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-HLA-ABC-FITC/PE (Klon G46-2.6)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-HLA-DR-FITC/PE (Klon TÜ36)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Siglec-7 biotinyliert (Klon 194212)	R&D Systems, Minneapolis, MN
anti-Siglec-7-PE (Klon F023-420)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Siglec-9-FITC (Klon E10-286)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Penta-His-HRP-Konjugat	Qiagen, Hilden
MAL II biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA
SNL-FITC	Vector Laboratories, Burlingame, CA
SA-FITC/PE	BD Pharmingen, Heidelberg

SA-HRP	Amersham, Freiburg
Schaf-anti-Maus-Ig-HRP	Amersham, Freiburg
Maus-anti-human-IgG-PE (Klon G18-145)	BD Biosciences, Heidelberg
anti-human IFN γ mAb (Klon 1-D1K)	Mabtech, Stockholm, Schweden
anti-human IFN γ mAb, biotinyliert (Klon 7B61)	Mabtech, Stockholm, Schweden
PKH-2, PKH-26 fluorescent cell linker dye	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vybrant™CFDA SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes, Inc., Eugene, OR

3.3 Geräte

Begasungsbrutschrank HERA Cell Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 Elite	MDS Nordion, Fleurus, Belgien
BioRad Power Pac 200	BioRad, München
Classic E.O.S. Filmentwicklungsmaschine	Agfa, Köln
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Electrophoresis unit mini-Protean II	Bio-RAD, München
Elektroporationsgerät	Fischer, Heidelberg
ELISpot Reader Immunospot	Cellular Technology Ltd., Aalen
Geltrockner	BioRad, München
Gene Quant II Photometer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Jura Impressa XF70	JURA Elektroapparate, Niederbuch- siten, Schweiz
Kryobox	Qualilab, Bezug über VWR International GmbH, Wien
pH-Meter Multical mit SenTix Plus Messkette	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Microplate reader Milenia Kinetic Analyzer	Milenia Biotec, Bad Nauheim
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Schüttler Heidolph Polymax1040	Heidolph, Schwabach
Semi Dry Transfer cell, Trans-Blot	Bio-RAD, München
Horizontale Electrophorese Unit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Test-Tube-Rotator	Snijders, Tilburg, NL
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
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

3.4 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapiere MN 827B	Macherey-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
Elektroporationsküvette, 4 mm	Peqlab, Erlangen
ELISpot Multi-Screen [®] -HA	Millipore, Bedford, MA
Nitrocellulose-Mikrotiter Platte	
Eppendorfröhrchen Safe-Lock; 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Polypropylen-Röhrchen; 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ
Gradientengele, Bis-Tris 4-12%	Invitrogen, Carlsbad, CA
Kanüle 21G (Sterican)	Braun, Melsungen
Kodak X-omat AR Film	Eastman Kodak Company, Rochester, NY
MACS-Säulen (LD, MS, LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrocellulosemembran 0,45 µM	Invitrogen, Carlsbad, CA
Polypropylen Säulen (5ml)	Pierce, Rockford, IL
Polystyrolröhrchen für FACS, 5 ml	Becton Dickinson, Discovery Labware, Bedford, MA
Polyvinylidenfluorid-Transfermembran (Hybond-P), PVDF-Membran	Amersham, Freiburg
Slide-A-Lyzer Dialysier-Kassette, 10000 MWCO	Pierce, Rockford, IL
Spin-X, Zentrifugenfilterröhrchen; 0,22 µM	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

Zellkulturflaschen (162 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²)	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Zellkulturplatten 6-Well	Becton Dickinson Labware, Franklin Lanes, USA
Zellkulturplatten 12-, 24-, 48-, 96-Well	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

3.5 Puffer und Lösungen

Plasmidaufreinigung (Plasmid Purification Kit, Qiagen)

Äquilibriumspuffer	Resuspensionspuffer
750 mM NaCl	50 mM Tris-Cl, pH 8,0
50 mM MOPS, pH 7,0	10 mM EDTA
15% Isopropanol (v/v)	100 µg/ml RNase A
0,15% Triton-X-100 (v/v) in dH ₂ O	in dH ₂ O

Waschpuffer	Lysepuffer
1,0 M NaCl	200 mM NaOH
50 mM MOPS, pH 7	1% SDS
15% Isopropanol (v/v)	in dH ₂ O
in dH ₂ O	

Neutralisierungspuffer	Elutionspuffer
3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5	1,25 M NaCl
in dH ₂ O	50 mM Tris-Cl, pH 5,5
	15% Isopropanol (v/v)
	in dH ₂ O

Puffer zur Erythrozytenlyse

8,29 g	Ammoniumchlorid
1 g	Kaliumhydrogencarbonat
0,037 g	Na ₂ -EDTA-2H ₂ O
pro 1000 ml	

Puffer zur Herstellung von Zelllysaten

50 mM	Tris-Cl, pH 7,4
150 mM	NaCl
1%	NP-40
1%	Natrium-Deoxycholat
1mM	EDTA
0,1%	SDS
2x	Protease-Inhibitor Complete (Zugabe direkt vor Gebrauch)

Imidazolpuffer zur Proteinaufreinigung

Äquilibrations-/ Waschpuffer A (pH 8,0)		Elutionspuffer B (pH 7,0)	
50 mM	Na ₂ HPO ₄	50 mM	Na ₂ HPO 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	

Puffer für analytische Gelelektrophorese

DNA-Ladepuffer (10x)	1 x TBE
	0,25% Bromphenolblau
	50% Glycerol
TBE-Puffer (5x) pH 8,3	270 g Tris-Base
	137,5 g Borsäure
	100 ml EDTA 0,5 M

Puffer für SDS-PAGE und Western Blot

Proben-Ladepuffer (NuPAGE, Invitrogen) 4x, pH 8,5, in dH ₂ O ad 10 ml	
4 g	Glycerol
0,682 g	Tris Base
0,666 g	Tris HCl
0,8 g	LDS (Lithium Dodecylsulfat)
0,006 g	EDTA
0,75 ml	Serva Blue G250, 1%-Lösung
0,25 ml	Phenolrot, 1%-Lösung

MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) 20x, pH 7,7

1 M MOPS (3-(N-morpholino) Propan Sulfonsäure)

1 M Tris Base

69,3 mM SDS

20,5 mM EDTA

in dH₂O ad 500 ml

Tris buffered saline (TBS) pH 7,6

12,1 g Tris-Base

40 g NaCl

in dH₂O ad 5000 ml

pH wurde mit HCl (1 M) eingestellt

TBS-Tween

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

CAPS-Transferpuffer (pH 11,0)

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

0,005% SDS

1% Methanol

in dH₂O

pH wurde mit NaOH (1M) eingestellt

Puffer für Coomassiefärbung

Fixierlösung 25% (v/v) Isopropanol

10% (v/v) Essigsäure

in dH₂O

Färbelösung 10% (v/v) Essigsäure

0,006% Coomassie Brilliant Blue G250

in dH₂O

Entfärbelösung 10% (v/v) Essigsäure

in dH₂O

MACS-Puffer

PBS + 0,5% humanes Serum-Albumin (HSA)

im Ultraschallbad für 2 h entgast

Biotinylierungspuffer

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

Calciumphosphatpräzipitation

BBS-Puffer

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

280 mM NaCl

1,5 mM NaH₂PO₄

in dH₂O

Die Lösung wurde mit 1 M Salzsäure exakt auf pH 6,96 eingestellt, steril filtriert, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert .

IFN_γ-ELISpot-Assay

ELISpot Waschpuffer	0,1% Tween 20 in PBS
Avidin-Peroxidase-Lösung	je 1 Tropfen Reagenz A und B (Vectastain ABC Kit) in 10 ml 0,1% Tween/PBS-Puffer
Acetatpuffer	15 mM Essigsäure 35 mM Natriumacetat in dH ₂ O
AEC-Entwicklerlösung	1 Tablette AEC-Chromogen (3-Amino-9-ethylcarbazol) gelöst in 2,5 ml Dimethylformamid, mit Acetatpuffer auf 50 ml aufgefüllt, steril filtriert, vor Gebrauch 25 µl H ₂ O ₂ 30% zugegeben

3.6 Bakterienstämme und Nährlösungen

Chemisch kompetente DH5 α TM-T1^R E. coli (Invitrogen)

Genotyp:

F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

LB-Medium (vor Gebrauch autoklaviert)	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	in 800 ml dH ₂ O

Methoden

3.7 Klonierung der Siglec-Fusionsproteine

Für die experimentelle Analyse wurden rekombinante Siglec-Fusionsproteine verwendet. Zur Herstellung wurden die extrazellulären Domänen von Siglec-7 und Siglec-9 kloniert, damit die Produkte gut wasserlöslich sind. So ist zwar eine Untersuchung der durch die intrazelluläre Domäne initiierten Signalkaskade nicht möglich, jedoch bleibt die Ligandenbindung der rekombinanten Proteine erhalten. Da auch die Transmembrandomäne nicht kloniert wurde, kann das neu synthetisierte Protein sezerniert werden und so aus dem Zellkulturmedium mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

Die Konstrukte wurden von Dr. Ingo Müller konzipiert und kloniert. Sie wurden zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Im Folgenden soll kurz die Klonierungsstrategie näher erläutert werden.

Zur Herstellung der Konstrukte wurden jeweils die aminoterminalen Immunglobulin-ähnliche Ligandenbindungsdomäne vom V-Typ sowie die beiden aminoterminal liegenden C2-Set-Domänen gewählt, um eine ausreichende Stabilität des Proteins zu gewährleisten.

Die Domänen wurden mit Hilfe der Primer TCTAGAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT und TCTAGAGTTGCAGGGAGAGGTTTCAGG für Siglec-7 sowie ATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCC und GGCTTTGCTCTGCAGGGAGA für Siglec-9 durch RT-PCR aus PBMCs kloniert. Zusätzlich wurden Restriktionsschnittstellen eingeführt, um das Amplikon in einen Expressionsvektor klonieren zu können. Hierbei handelte es sich um den Expressionsvektor pcDNA 3.1 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA). Dieser enthält einen T7-Promotor sowie eine Ampicillin-Resistenzkassette zur prokaryontischen Expression und Selektion. Darüber hinaus verfügt er über einen CMV-Promotor und eine Neomycin-Resistenzkassette zur Expression und Selektion in eukaryontischen Zellen. Siglec-7 bzw. Siglec-9 wurden mittels entsprechender Restriktionsenzyme aminoterminal zum viralen Epitop V5 in die multiple cloning site inkloniert. Restriktionsenzyme, Ligase und Puffer (Invitrogen) wurden dabei nach Anleitung des Herstellers verwendet. Um eine spätere Oligomerisierung des Proteins mittels Streptavidin-(R)-Phycoerythrin zu ermöglichen, wurde eine Biotinylierungszielsequenz über Primer extension eingeführt. Hierzu wurden die

Sequenzen ATAAGGGCCCGGATCCCTGCATCATATTCTGGATGCACAGAAAAT und GGTTACCGGTACGATGATTCCACACCATTTTCTGTGCATCCAGAA benutzt. Die Produkte wurden 3' vom jeweiligen Insert in das Standardgerüst des Vektors eingebaut. Das virale Epitop V5 wurde herausgeschnitten. Carboxyterminal liegt ein aus sechs konstitutiven Histidinen bestehender His-Tag, der eine Aufreinigung und eine Detektion des Proteins ermöglicht. Die Klonierung wurde so durchgeführt, dass ein Stopcodon nach der Sequenz des His-Tags die Sequenz des Fusionsproteins beendet. Abb. 3.1 zeigt schematisch den Vektor, in den das Insert für das Siglec-7-Fusionsprotein kloniert wurde. Durch Sequenzierungsanalysen wurde bestätigt, dass die Konstrukte einen durchgängigen Leserahmen mit der korrekten Sequenz enthielten. Hierbei wurden die Primer CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTG (sense) und AGACCGAGGAGAGGGTTAG-GGA (antisense) benutzt. Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Eine Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit Hilfe des Blast-Alignment-Programmes (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Zur Amplifizierung der Konstrukte wurden anschließend kompetente E.coli-Bakterien des DH5 α -Stammes transformiert.

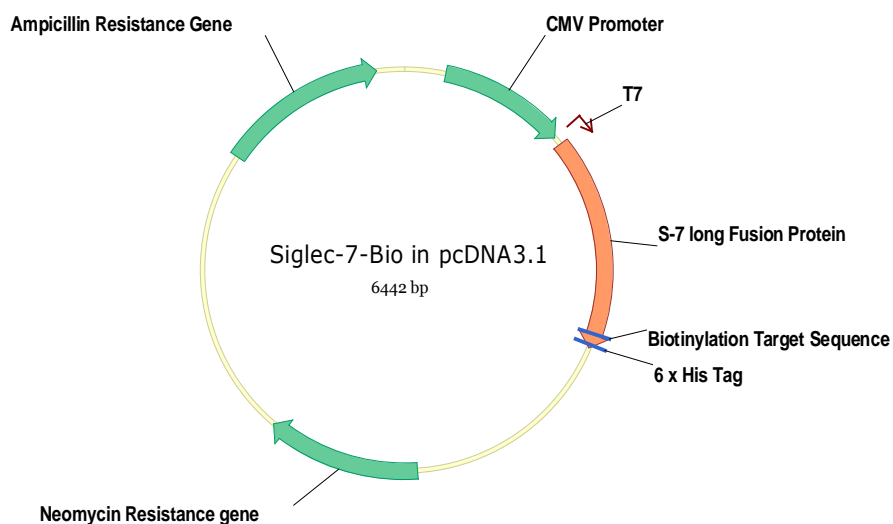


Abb. 3.1: Siglec-7 in pcDNA3.1

3.7.1 Plasmidisolierung

Einzelkolonien positiver Klone wurden in 2 ml LB-Medium unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin für 12 h bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Ein Teil dieser Kultur wurde im Verhältnis 4:1 mit sterilem Glycerol gemischt und in Einfrierröhrchen bei -80°C weggefroren.

Eine Kultur von E. coli des DH5α-Stammes, die das Siglec-7- bzw. Siglec-9-Plasmid enthielten, wurde in 250 ml LB-Medium unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 200 UpM im Bakterienschüttler vermehrt. Die Aufreinigung der DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Purification Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde die Bakteriensuspension bei 6000 x g für 15 min abzentrifugiert, das Pellet in Puffer resuspendiert und eine alkalische Lyse durchgeführt. Der Überstand wurde auf eine Anionenaustauschersäule gegeben. Die Säule wurde mit Waschpuffer gewaschen und die DNA mit Elutionspuffer höheren Salzgehaltes eluiert. Anschließend wurde eine Fällung mit Isopropanol bei 15000 x g und 4°C durchgeführt und das Pellet mit Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die erhaltene DNA in dH₂O gelöst und bei 4°C gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.7.2 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde die optische Dichte (OD) einer wässrigen 1:100-Verdünnung der Plasmidpräparation gegen Wasser als Leerwert im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Um Aussagen über die Reinheit der DNA zu treffen, wurde der Quotient aus OD_{260 nm} zu OD_{280 nm} gebildet, er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die Berechnung der Konzentration an DNA wird durch folgende Formel möglich:

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

- c Konzentration der Ausgangslösung
- V Verdünnungsfaktor
- F Multiplikationsfaktor (48 [µg/ml] für dsDNA)

3.7.3 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der Sequenz der Plasmide wurden Kontrollverdaus durchgeführt. Die zu erwartenden Fragmente wurden mit Hilfe der VektorNTI-Software (InforMax,

Version 9.0) errechnet. Es wurden 2 µg des Plasmides in einem 20 µl-Ansatz mit 1x Puffer NEB 2, je 40 U Hind III und Xba I, sowie BSA zusammengegeben. Der Ansatz wurde mit dH₂O aufgefüllt und für 60 min bei 37°C inkubiert.

3.7.4 Analytische Gelelektrophorese

Durch Gelelektrophorese werden negativ geladene Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße und elektrophoretischen Beweglichkeit aufgetrennt. Zur Durchführung wurden die Proben mit 10 x DNA-Laufpuffer im Verhältnis 1:10 gemischt und auf einem 1% Agarosegel analysiert. Parallel wurde ein DNA-Marker (100 bp-Leiter) geladen. Die Agarose wurde in TBE-Puffer (1x) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in einen Träger mit Gelkamm gegossen. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Laufkammern bei 5-7 V/cm Gellänge in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE für 15 min gefärbt und anschließend mit dH₂O gewaschen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und emittiert nach Anregung mit ultraviolettem Licht bei 590 nm. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografie des Gels unter ultraviolettem Licht.

3.8 Expression der Siglec-Fusionsproteine

3.8.1 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation

Die Expression der Siglec-Fusionsproteine erfolgte in 293T-Zellen. Hierbei handelt es sich um humane, embryonale Nieren-Fibroblasten, die mit SV40 large T-Antigen transfiziert wurden. Es wurden eukaryontische Zellen gewählt, um eine Glykosylierung des Proteins sicherzustellen. Diese spielt bei der korrekten Faltung des Proteins und der Ligandenerkennung eine wesentliche Rolle. 293T-Zellen wurden mittels Calciumphosphatpräzipitation (Chen und Okayama, 1987) transfiziert. Hierzu wurden 293T-Zellen in DMEM/HAMS F12 + 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu etwa 80% konfluent waren. 2 h vor Transfektion wurde ein Mediumwechsel zu antibiotikafreiem Medium bestehend aus 1/6 Ham's F12, 5/6 DMEM, 10% FCS und 2 mM Glutamin durchgeführt. Zur Durchführung der Transfektion wurden 125 µl 2,5 M CaCl₂, 1075 µl dH₂O und 50 µg DNA pro Transfektion einer 162 cm²-Zellkulturflasche tropfenweise zusammengegeben.

Anschließend wurde diese Lösung tropfenweise mit 1250 µl BBS pH 6,96 gemischt. Nach 20 min Inkubation wurde die Präzipitatlösung tropfenweise in 25 ml Nährmedium gegeben.

Nach 15-18 h fand ein Mediumswechsel zu Serum-reduziertem Medium bestehend aus 95% DMEM, 5% Ham's F12, 0,5% FCS, 2 mM Glutamin statt, um für die Aufreinigung störendes Albumin zu minimieren. Bis zur Aufreinigung, die nach weiteren 24 Stunden durchgeführt wurde, wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Zur Bestimmung des optimalen pH-Werts des BBS-Transfektionspuffers und zur Überprüfung der Transfektion wurden in einem parallelen Ansatz 293T-Zellen mit einem Lac-z-Expressionsvektor, welcher für β-Galaktosidase kodiert, transfiziert. Die Transfektion wurde analog zur Transfektion mit Siglec-Plasmiden durchgeführt. Es wurden dabei 4 µg Lac-z-Plasmid pro Vertiefung einer 6-well-Platte eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und nach 24 h gefärbt. Hierzu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ mit 5% (v/v) Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Zur Färbung wurde Substrat in Form von x-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) zugegeben, das nach katalytischer Umsetzung durch Galaktosidase in einer Blaufärbung der Zellen resultiert. Die Zellen wurden hierbei für 2-24 h in der Färbelösung bestehend aus 5 mM Kaliumferricyanid, 5 mM Kaliumferrocyanid, 2 mM Magnesiumchlorid, 1 mg/ml x-Gal in PBS bei 37°C inkubiert. Über Auszählung der blau gefärbten Zellen am Lichtmikroskop konnten nach 2-4 h Aussagen über die erfolgreiche Durchführung der Transfektion und die Transfektionseffizienz gewonnen werden.

3.8.2 Stabile Transfektion

Zur Herstellung stabiler Klone wurden transient transfizierte 293T-Zellen nach Abnahme des Überstandes für die Proteinaufreinigung in G418-Selektionsmedium kultiviert. In Vorversuchen wurde mittels Titrationsreihen eine Konzentration von 2 mg/ml G418 als toxisch für untransfizierte 293T-Zellen bestimmt und daher in weiteren Versuchen als Konzentration eingesetzt. Die so behandelten Zellen wurden in 96-well-Platten kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Es wurde versucht, Einzelzellkolonien hochzuziehen. Die noch lebenden Zellen

wurden in Selektionsmedium kultiviert und 24 h vor Aufreinigung einem Mediumswechsel zu Serum-reduziertem Medium bestehend aus 95% DMEM, 5% Ham's F12, 0,5% FCS, 2 mM Glutamin unterzogen.

Zur Herstellung stabiler Siglec-9 exprimierender Klone wurden 293T-Zellen mit linearisiertem Siglec-9-Plasmid elektroporiert. Hierfür wurde zunächst das Siglec-9-Plasmid einem Restriktionsverdau mit dem im Vektor nur einfach schneidenden Restriktionsenzym Bgl II unterzogen. In zwei 50 µl-Ansätzen wurden dabei je 50 µg Siglec-9-Plasmid mit 30 U Bgl II-Enzym und 5 µl NEB 3-Puffer gemischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das verdaute Plasmid wurde durch Gelelektrophorese auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, die linearisierten Plasmidbanden nach kurzer Kontrolle unter UV-Licht lokalisiert, ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel Extraktion Purification Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Elektroporation wurde die aufgereinigte Verdauprobe mit 1×10^7 293T-Zellen in eiskaltem PBS in einer Elektroporationsküvette (Peqlab) zusammengegeben und im Elektroporator (Fischer) einem Impuls von 360 V für 10 msec ausgesetzt. Unmittelbar danach wurden die Zellen in vorgewärmtes Kulturmedium überführt und auf 96-well-Platten in unterschiedlichen Dichten ausgesät. Nach zwei Tagen wurde ein Mediumwechsel zu Selektionsmedium bestehend aus DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin + 2 mg/ml G418 durchgeführt. Auch hier wurde versucht, Einzelzellkolonien hochzuziehen und die noch lebenden Zellen nach einigen Wochen in Selektionsmedium überführt. Zur Aufreinigung wurden die Zellen für 24 h in Serum-reduziertem Medium kultiviert und Protein aus dem Überstand isoliert.

3.8.3 Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie

Das His-Tag-tragende Fusionsprotein wurde aus dem Überstand transfizierter 293T-Zellen aufgereinigt. Die transient transfizierten Zellen wurden anschließend verworfen. Die Aufreinigung erfolgte über Affinitätschromatographie. Die Histidine sollten dabei durch Nickel gebunden werden. Hierzu wurden Polypropylen-Säulen mit 500 µl Nickel-NTA-Agarose beads beladen und mit 3 ml Äquilibrationspuffer gewaschen. Das Zellkulturmedium wurde bei 350 x g für 10 min abzentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand mit 1/5 Volumen Äquilibrationspuffer versetzt und auf die Säulen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml Waschpuffer wurde das Protein mittels 250 mM-haltigem Imidazol-Puffer in 7 250 µl-Fractionen

eluiert. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration in Zentrifugationsröhrchen (Centricons YM-10 oder Amicon Ultra-15 centrifugal filter units) mit einem Ausschlussgewicht von 10 kDa bei 3500 x g aufkonzentriert. Die Zentrifugation wurde beendet, wenn 1/10 des Anfangsvolumens erreicht wurde, typischerweise 250 µl. Proteine wurden anschließend zweimal in 2 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8 aufgenommen und erneut bis auf 1/10 des Anfangsvolumens durch Zentrifugation aufkonzentriert. Wurde nachfolgend keine Biotinylierung des Proteins durchgeführt, wurden die Proteine zweimal mit 2 ml Hank's versetzt und aufkonzentriert.

Zum Proteinnachweis und zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden BCA-Proteinbestimmung, SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Die erhaltenen Proteine werden im Folgenden als Siglec-7^{ext} und Siglec-9^{ext} bezeichnet.

3.8.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine durch Bindung von Natriumdodecylsulfat negativ geladen und denaturiert, Disulfidbrücken werden durch DTT gebrochen. Die Proteine können so im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Mobilität der Proteine ist hierbei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekularmassen. Für die Elektrophorese wurden kommerziell erhältliche 4-12%ige Bis-Tris-Gradienten-Gele verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 10 µl 1x Ladepuffer mit 0,093 g/ml DTT bei 95°C für 5 min erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben kurz zentrifugiert und 20 µl auf das Gel aufgetragen. Zur Herstellung von Zelllysaten adhärenter Zellen wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, der Boden der Flasche mit eiskaltem Lysepuffer bedeckt und die Zellen anschließend mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Das Lysat wurde in Eppendorfgefäßen aufgenommen, 15 min bei 4°C rotiert, bei 14000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert und der resultierende Zelllysate-Überstand bei -20°C gelagert oder für Analysen weiter verwendet. Für den Proteinlauf wurden Kämme mit 10 Taschen (30 µl Ladevolumen/Tasche) verwendet. Als Marker wurden Rainbow coloured molecular weight marker, PeqGold Protein Marker oder die 6 x His Ladder aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in der X-cell Surelock Kammer der Firma Invitrogen bei konstant 150 V für 60 min. Als Laufpuffer wurde MOPS SDS Running Buffer verwendet.

3.8.5 Proteinbestimmung

Eine Proteinbestimmung wurde mittels des Micro BCA™ Protein Assay Kits (Pierce) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Konzentrationsbestimmungsmethode, der eine Biuret-Reaktion zugrunde liegt: Cu^{+2} wird durch Protein im alkalischen Medium zu Cu^{+1} reduziert. Cu^{+1} kann über eine Farbreaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) detektiert werden. Dabei wird das violette Produkt durch Chelatbildung von zwei BCA-Molekülen mit einem Kupfer-Ion gebildet. Dieser wasserlösliche Komplex absorbiert Licht bei 562 nm. Eine lineare Bestimmung der Proteinkonzentration über einen Messbereich von 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ wird so ermöglicht. Als Vergleich wird eine Standardkurve ausgehend von Verdünnungsreihen bekannter Konzentrationen an BSA mitgeführt.

Um möglichst geringe Testmengen an Protein einsetzen zu müssen, wurde die Proteinbestimmung in einer Mikrotiterplatte entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Je 25 μl BSA-Standard in Konzentrationen von 2 mg/ml bis 25 $\mu\text{g/ml}$, Proteinproben und PBS zur Bestimmung des Leerwertes wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je 200 μl BCA-Lösung (50:1-Verdünnung Reagenz A [Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA Detektionsreagenz, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid] mit Reagenz B [4 % Kupfersulfat-Pentahydrat]) für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 562 nm am Microplate reader bestimmt. Zur Auswertung wurde der Leerwert von den Messwerten subtrahiert und eine Standardkurve durch Auftragen der korrigierten BSA-Extinktionswerte bei 562 nm gegen die BSA-Konzentrationen in $\mu\text{g/ml}$ erstellt. Anhand der Standardkurve wurden die Konzentrationen der Proteinproben bestimmt.

3.8.6 Proteinfärbung nach Coomassie

Zur Detektion von Proteinen wurden 4-12%ige Bis-Tris-Gradientengele zunächst für 30 min in Fixierlösung inkubiert, anschließend für zwei Stunden mit Färbelösung gefärbt und danach bis zum gewünschten Kontrast in Entfärbelösung entfärbt. Alle

Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Durch Auftragen eines Albuminstandards im Bereich von 10-50 µg/ml war es möglich, eine Konzentrationsabschätzung der aufgetragenen Proteinmenge durchzuführen.

Zur Dokumentation wurde das Gel entweder fotografiert oder getrocknet. Hierzu wurde das Gel luftblasenfrei zwischen mit Wasser gespülte Folie gelegt und mit Hilfe einer Vakuumpumpe für zwei Stunden bei 80°C getrocknet.

3.8.7 Western Blot-Analyse

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf einen entsprechenden Trägerfilter zur weiteren Behandlung mit Antikörpern zu übertragen, wurde ein Semi Dry Blot durchgeführt. Dabei werden die aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylgelmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die lokale Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Zur Durchführung des Blots wurden Gel, Transfermembran und vier Blottingpapiere gleicher Größe in Transferpuffer für 5 min äquilibriert. Die einzelnen Komponenten wurden in der semi-dry Blotkammer zusammengebaut. Auf 2 Blottingpapiere wurde zunächst die Membran und anschließend das Gel sowie zwei weitere Blottingpapiere aufgebracht. Der Transfer wurde bei 0,06 A für 60 min ($0,8 \text{ mA/cm}^2$) durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran zunächst zweimal für je 10 min mit TBS-Puffer gewaschen und für 60 min mit 2% bovinem Serumalbumin in TBS (pH 7,6) bei Raumtemperatur blockiert.

Die Detektion der Proteine erfolgte je nach Fragestellung mit unterschiedlichen Antikörpern:

Zur Detektion der Siglec-Fusionsproteine über den His-Tag wurde der HRP-konjugierte anti-Penta-His-Antikörper (Qiagen) eingesetzt. Hierzu wurde die Membran nach dem Blockieren zweimal mit TBS-Tween und einmal mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Penta-His-HRP-Konjugat (1:2000 in TBS/2% BSA verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Um Biotinylierung nachzuweisen, wurde mit HRP-konjugiertem Streptavidin (1:2500 in TBS/2% BSA verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Detektion von unbiotinyliertem Siglec-7 wurde mit biotinyliertem anti-Siglec-7-Antikörper (0,1 µg/ml) bei 4°C über Nacht und HRP-konjugiertem Streptavidin als Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Membranen jeweils zweimal mit TBST und einmal mit TBS für 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz mit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat (Pierce, Rockford, IL). Hierzu wurde die Membran für 5 min im Dunkeln mit den beiden im Verhältnis 1:1 gemischten Entwicklungslösungen inkubiert, anschließend in Folie eingeschweißt und mit X-omat AR Filmen für unterschiedlich lange Belichtungszeiten belichtet. Die Filme wurden in der Classic E.O.S. Filmentwicklungsmaschine entwickelt.

3.8.8 Deglykosylierung mittels PNGase

Bei PNGase F handelt es sich um eine Amidase, die zwischen GlcNAc und Asparaginresten N-glykosidisch verbundener Glykoproteine schneidet.

Für die PNGase-Behandlung vor dem Blotten wurden 20 µg Protein bei 100°C für 10 min in 1 x Glykoprotein-Denaturierungspuffer (5% SDS, 10% β-Mercaptoethanol) denaturiert und mit NP-40, G7 Puffer (0,5 M Natriumphosphat, pH 7,5) und 25 U PNGase F in einem 20 µl Ansatz für eine Stunde bei 37°C nach Angaben des Herstellers inkubiert.

3.8.9 Neuraminidasebehandlung

Zur Hydrolyse von O-glykosidischen α2,3-, α2,6- und α2,8-Verbindungen terminaler Sialinsäuren, wurden bis zu 1×10^7 Zellen mit 0,5 U Neuraminidase (*Vibrio cholerae*) bei 37°C für 1h in 100 µl RPMI + 10% (v/v) FCS inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in Versuchen eingesetzt.

3.8.10 Enzymatische Biotinylierung

Siglec-Fusionsproteine wurden enzymatisch biotinyliert. Hierzu wurden die Proteine mit je 10% (v/v) Biomix A und B, sowie 2,5 µg Biotin-Protein-Ligase BirA 500 pro 10 nmol Protein vereinigt und für 60 min auf dem Thermoschüttler bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Protein steril filtriert (Spin-X, 0,22 µm, 10000 x g, 2 min, RT) und für 12 Stunden gegen Hank's buffered saline im Slide-A-Lyzer Dialysier System (Ausschlußgewicht 10 kDa) bei 4°C dialysiert.

3.8.11 Oligomerisierung von Siglec-Fusionsproteinen

Die Tetramerisierung des Fusionsproteins wurde mit Streptavidin-(R)-Phycoerythrin-Konjugat durchgeführt. Die Proteine wurden hierzu bei 4°C rotierend mit Streptavidin-(R)-Phycoerythrin-Konjugat (M = 292.800 Da) im molaren Verhältnis von 4:1 in 10 Einzelportionen versetzt. Die Bindungsfähigkeit des Tetramers wurde durchflußzytometrisch getestet.

Die einzusetzende Menge an Streptavidin-(R)-Phycoerythrin-Konjugat ergab sich wie folgt:

Theoretische Berechnung der Molarität der Siglec-7/9^{ext} Lösung:

$$\frac{c_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} [\mu\text{g/ml}]}{M_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} [\mu\text{g/mol}]} = c_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} [\text{mol/ml}]$$

$$c_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} [\text{mol/ml}] \times V_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} [\text{ml}] = n_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} [\text{mol}]$$

Theoretische Berechnung der Molarität von Streptavidin-(R)-Phycoerythrin-Konjugat

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

Berechnung des benötigten Volumens an Streptavidin-(R)-Phycoerythrin-Konjugat

$$\frac{n_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} [\text{mol}]}{c_{\text{SA-PE}} [\text{mol/ml}]} = V_{\text{SA-PE}} [\text{ml}]$$

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

mit:

$$M_{\text{Siglec-7/9}^{\text{ext}}} \approx 55.000 \text{ Da} = 55.000 \text{ g/mol} = 5,5 \cdot 10^{10} \mu\text{g/mol}$$

$c_{\text{Siglec-7/9}}$ abgeschätzt aus Coomassie Gel

$V_{\text{Siglec-7/9}}$: Volumen zum Zeitpunkt der Probennahme für die Gelelektrophorese

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

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

Für den Einsatz in Western-Blot-Analysen wurden die Siglec-Fusionsproteine mit Streptavidin-HRP konjugiert. Die Tetramerisierung erfolgte analog zu den Angaben bezüglich Streptavidin-(R)-Phycoerythrin. Für die Berechnung der einzusetzenden Menge wurde für Streptavidin-HRP eine Konzentration von $4,9 \times 10^{-9}$ mol/ml zugrunde gelegt. Die erhaltenen Tetramere werden im Folgenden als [Siglec-7]₄ : SA-PE und [Siglec-9]₄ : SA-PE bezeichnet.

3.9 Aufreinigung von PBMC durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Aufreinigung von PBMC wurden 15 ml Biocoll-Lösung mit 30 ml frischem, heparinisiertem, peripherenvenösem Blut von gesunden, freiwilligen Spendern überschichtet. Der Ansatz wurde bei 960 x g für 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Plasmaphase abgenommen und aufgehoben. Die PBMC wurden aus der Interphase vorsichtig abgenommen, in frische Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS bei 960 x g gewaschen. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit PBS + 2% FCS bei 400 x g gewaschen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellzählgerätes COBAS MICROS bestimmt.

3.10 Aktivierung von PBMC

In einigen Versuchsansätzen wurden frisch isolierte PBMC stimuliert. Hierfür wurden die Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit 3 µg/ml PHA, 250 U IFN γ , 100 U IL-2 oder 1 µg/ml OKT 3 für 12, 24 oder 48 h bei 37°C inkubiert.

3.11 Zelllinien und Zellkultur

Zelllinie	Charakterisierung	Bezugsquelle	Kulturmedium
293T	Humane embryonale Nieren-Fibroblastenlinie, mit SV40 large T-Antigen transfiziert	Prof. Dr. R. Lammers (Med. Klinik IV, Universität Tübingen)	DMEM/HAMS F12 + 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
K562	Chronische myeloische Leukämie-Linie	Dr. G. Kerst (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. II, Tübingen)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin

Material und Methoden

PLB-985	Akute myeloische Leukämie	Dr. G. Kerst (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. II, Tübingen)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
HL 60	Akute Promyelozyten-Leukämie	Dr. G. Kerst (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. II, Tübingen)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
KG1a	Promyeloblastische Leukämie	Dr. G. Kerst (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. II, Tübingen)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
CEM	T-Zelllinie	Dr. I. Müller (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. I, Tübingen)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Jurkat	T-Zelllinie	Prof. Dr. P. Brossart (Med. Klinik II, Abt. Hämatologie, Onkologie, Immunologie und Pulmonologie, Universität Tübingen)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
KIHe Hest Oaw OvCar 29 GG Hey FraW Hi BG-1 MT Elgr	Ovarial-Carcinomlinien	PD Dr. B. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen)	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Ck 19 SkBr 3 Ks wt	Mamma-Carcinomlinien	PD Dr. B. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen)	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Ks 24.22	Mamma-Carcinomlinie, transfiziert mit Her2 neu und CD80	PD Dr. B. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen)	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin, 250 µg/ml Zeocin, 1 mg/ml G418
Ks 4	Mamma-Carcinomlinie, transfiziert mit Her2 neu und CD80	PD Dr. B. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen)	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin, +1 mg/ml G418
Ks24	Mamma-Carcinomlinie, transfiziert mit Her2 neu und CD80	PD Dr. B. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen)	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin, 250 µg/ml Zeocin

Material und Methoden

Ks mock	Mamma-Carcinomlinie, transfiziert mit Leervektor	PD Dr. B. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen)	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin, 250 µg/ml Zeocin, 1 mg/ml G418
Skov 3	Ovarial-Carcinomlinie	PD Dr. B. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen)	McCoy + 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
SY5Y wt NB69 wt	Neuroblastomlinie	Prof. Dr. A. Eggert (Universitäts-Kinderklinik Essen, Abt. für Hämatologie, Onkologie und Endokrinologie)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
SY5Y TrkA, TrkB, Plncx NB69 TrkA, Plncx	Neuroblastomlinie, transfiziert mit TrkA, TrkB oder Vektorkontrolle	Prof. Dr. A. Eggert (Universitäts-Kinderklinik Essen, Abt. für Hämatologie, Onkologie und Endokrinologie)	RPMI1640 + 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 1 mg/ml G418
Sk-N-Be	Neuroblastomlinie	PD Dr. P. Lang (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. I, Tübingen)	EMEM und Ham's F12 1:1-Gemisch + 10% (v/v) FCS: EMEM (1,2 g/l NaHCO ₃) + 1% 200 mM L-Glutamin, 1% 100 mM NaPyruvat, 1% 100 mM nicht essentielle Aminosäuren Ham's F12K (1,5 g/l Na HCO ₃) + 1% 200 mM L-Glutamin
Hep G2	Hepatozelluläre Carcinomzelllinie	PD Dr. M. Schenk (Universitätsklinik für allgemeine Chirurgie, Tübingen)	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
RD	Humane, alveoläre Rhabdomyosarkomlinie	ATCC	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
A204	Humane, embryonale Rhabdomyosarkomlinie	ATCC	DMEM + 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
MSC	Mesenchymale, multipotente Stromazellen	Dr. I. Müller (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abt. I, Tübingen)	DMEM (1 g/l Glucose) + 5% (v/v) humanes fresh frozen plasma, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 80 I.E. Heparin Sulfat + 10 ⁸ /ml Thrombozyten

Die für die Analysen benötigten Zellen wurden in einem Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Zur Passagierung wurde bei Suspensionszellen alle 2-3 Tage ein Teil des Mediums ausgetauscht, adhärente Zellen wurden trypsiniert. Hierfür wurde das Medium dekantiert, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02% (w/v) in PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺) für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen gelöst, abzentrifugiert und in frischem Kulturmedium im

Verhältnis 1:2 bis 1:4 je nach Zelllinie umgesetzt. 293T-Zellen wurden ohne Zugabe von Trypsin durch Klopfen abgelöst, resuspendiert und auf Kulturflaschen verteilt. Leukämische Blasten von pädiatrischen Patienten waren in flüssigem Stickstoff gelagert und wurden aufgetaut, in 8 ml RPMI1640 mit 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen und sofort für die Experimente eingesetzt.

3.11.1 Mesenchymale, multipotente Stromazellen

Mesenchymale, multipotente Stromazellen wurden aus Knochenmarkpunktionen nach Erythrozytenlyse durch Plastikadhärenz gewonnen. Zellen wurden in DMEM_{FFPP}-Medium (1 g/l Glucose) mit 5% (v/v) humanem gefrorenem Frischplasma (GFP), 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 80 I.E. Heparin Sulfat und 10⁸/ml Thrombozyten (Blutbank Universität Tübingen) kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 7 min bei 37°C mit 1:10-verdünntem EDTA-freiem Trypsin behandelt, durch Klopfen gelöst und in Hank's buffered saline aufgenommen.

3.11.2 Zellisolation aus Lymphknoten und Thymusgewebe

Restgewebe von humanen Lymphknoten und Thymus aus chirurgischen Eingriffen wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Eva Tolosa (Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen, jetzt Universitätsklinikum Hamburg) zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 242/2004V vom 06.08.2004).

Die entsprechenden Gewebeproben wurden in RPMI1640 mit 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gelagert. Zur Vereinzelung der Zellen wurde das Gewebe durch ein Zellsieb (Maschenweite 70 µm) gedrückt und mit Medium gespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 400 x g für 10 min abzentrifugiert. Ein Teil der Zellen wurde für durchflusszytometrische Analysen eingesetzt, die restlichen Zellen wurden kryokonserviert.

3.11.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden zum Einfrieren bei 400 x g für 10 min bei RT abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Einfriermedium (90% FFP, 10% DMSO für MSC; 90% FCS, 10% DMSO für alle anderen verwendeten primären Zellen und Zelllinien) aufgenommen und in Kryovials überführt. Die so behandelten Zellen wurden in einer Kryo-Box bei -80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt in flüssigen Stickstoff zur längeren Lagerung überführt.

Auftauen von Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Zellen wurden sofort in 8 ml vorgewärmtes Medium überführt, abzentrifugiert, gewaschen und mit entsprechendem Medium in Kultur genommen.

3.12 Durchflusszytometrische Analyse

Durchflusszytometrische Analysen wurden mit Hilfe eines FACS-Calibur durchgeführt. Hierbei wurde die FITC-Fluoreszenz im FL1-Kanal, die PE-Fluoreszenz im FL2-Kanal, die APC-Fluoreszenz im FL4-Kanal und Propidiumjodid im FL3-Kanal gemessen. Erhaltene Daten wurden mit der CellQuest Software (Version 3.1) analysiert.

Da einige Lektine für ihre Bindung Ca^{2+} -Ionen benötigen, wurden die Färbungen mit Lektinen und mit Siglec-Tetrameren in Hank's buffered saline mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 2% FCS für 15 min im Dunkeln auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Hank's buffered saline mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 2% FCS gewaschen. Bei Färbungen mit unmarkierten Antikörpern wurde zwischen der Erstinkubation und der Zweitinkubation mit dem entsprechenden Detektionsantikörper dreimal mit Hank's buffered saline mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 2% FCS gewaschen. Alle übrigen Färbungen wurden in PBS + 2% FCS als FACS-Puffer durchgeführt. Für Färbungen wurden 300000 Zellen/Ansatz und 5 µg/ml Antikörper eingesetzt, für Lektinfärbungen wurden 2,5 µl einer 1:200-Verdünnung von SNL-FITC [Stammlösung 2 mg/ml] und 1 µl einer 1:10-Verdünnung von biotinyliertem MAL II [Stammlösung 2 mg/ml] sowie anschließend 1 µl SA-FITC zur Detektion eingesetzt. Die Konzentration von eingesetzten Siglec-Tetrameren wurde nach jeder Aufreinigung neu bestimmt (s. 3.8.5) und die optimale Menge vor jedem Versuch durch Titrationsreihen ausgetestet. Als Negativkontrolle wurde hierbei Streptavidin-PE in äquivalenter Menge zur Oligomerisierung eingesetzt. Färbeansätze bestanden

aus Kompensationskontrollen, Negativ- und gegebenenfalls Positivkontrollen neben den zu untersuchenden Ansätzen. Nicht vitale Zellen wurden auf der Basis ihrer Eigenschaften im Light scatter elektronisch herausgegated. Je 1 µl einer 50 µg/ml-Lösung Propidiumjodid wurde zur Überprüfung der Zellvitalität unmittelbar vor der FACS-Messung zu den Ansätzen gegeben.

3.13 Aufreinigung von NK-Zellen

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) von gesunden Spendern wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. CD56⁺ NK-Zellen wurden durch immunomagnetische Sortierung (Miltenyi Biotec) aus PBMC nach Angaben des Herstellers isoliert. NK-Zellen wurden dabei entweder durch positive Selektion mit Hilfe von CD56-Microbeads oder aber durch Depletion mit Hilfe des NK cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) isoliert. NK-Zellen wurden nach Isolation in RPMI1640 kultiviert, welches mit 5% (v/v) autologem Serum, 2 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde. Zur Aktivierung wurden NK-Zellen mit 1000 U/ml IL-2 stimuliert. Die Zellen wurden nach 48stündiger Inkubation für Versuche eingesetzt.

3.14 Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten

Monozyten wurden aus PBMC entweder durch Plastikadhärenz oder durch immunomagnetische Sortierung (Miltenyi Biotec) mittels CD14-Microbeads nach Angaben des Herstellers isoliert. Im ersten Fall wurden PBMC durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und mit 13 ml RPMI1640, supplementiert mit 5% (v/v) autologem Plasma, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in eine Zellkulturflasche (75 cm²) gegeben. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und die adhärennten Zellen in Medium kultiviert.

Im zweiten Fall wurden bis zu 1×10^8 PBMC mit einer Dichte von 10^7 Zellen pro 80 µl in PBS + 0,5% humanem Serumalbumin resuspendiert. Es wurden 15 µl anti-CD14 MACS MicroBeads-Suspension/ 10^7 Zellen zugefügt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Es wurde ein Waschschriff mit der 20-fachen Menge an MACS-Puffer bei 400 x g durchgeführt, das Pellet in 500 µl Puffer aufgenommen und zur Trennung auf eine mit 3 ml Puffer äquilibrierte LS-Säule im VarioMACS-Magneten gegeben. Nach

Einlaufen der Zellsuspension wurde die Säule dreimal mit 500 µl Puffer gespült. Der Durchfluß wurde als CD14-negative Fraktion gesammelt. Die Säule wurde aus dem Magneten genommen und mit 5 ml Puffer unter Zuhilfenahme eines Stempels eluiert. Eluat und Durchfluß wurden abzentrifugiert. Von beiden Fraktionen wurden Proben für durchflußzytometrische Analysen bezüglich der erreichten Reinheit abgenommen. Die Zellen wurden in entsprechenden Dichten ausgesät und mit RPMI1640, supplementiert mit 5% (v/v) autologem Plasma, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin kultiviert.

Zur Generierung von Dendritischen Zellen wurden Monozyten jeweils an den Tagen 0, 2 und 4 nach Isolation mit 500 U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF versetzt. An Tag 5 wurde zu einem Teil der Kultur für 48 Stunden ein Reifungscocktail bestehend aus 1000 U/ml IL-6, 10 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF- α und 1 µg/ml PGE₂ gegeben.

3.15 Generierung antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen

Zur Generierung Neuroblastom-spezifischer, zytotoxischer T-Lymphozyten wurden Dendritische Zellen mit Antigen beladen, gereift und mit T-Zellen kokultiviert.

Zur Antigenbeladung wurden Dendritische Zellen nach dreimaliger Stimulation mit 500 U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF am Tag 4 nach Isolation gezählt und abzentrifugiert. Die Zellzahl wurde auf $6,7 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt und 1,5 ml der Zellsuspension pro Vertiefung einer 6-Lochplatte gegeben. Antigen wurde in Form von Peptiden (10 µM) zugegeben. Für fünf Proteine, die in cDNA-Array-Analysen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Eggert (Universitäts-Kinderklinik Essen) eine hohe und nicht differentielle Expression in der SY5Y-Zelllinie ergaben, wurden mit Hilfe der Datenbank SYFPEITHI durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stevanović vorhergesagt und synthetisiert. Peptide mit den Sequenzen SSDALDKIRY (HSP 90A), ASDALDKIRY (HSP 90B), ASEDLLKEHY (Nukleosid Diphosphatkinase A) oder FTEEEVILQY (Integrin β 1) wurden eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Anschließend wurde ein Reifungscocktail bestehend aus 1000 U/ml IL-6, 10 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF- α und 1 µg/ml PGE₂ zugegeben. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. CD8⁺ T-Zellen wurden durch immunomagnetische Separation isoliert und maximal im Verhältnis 30:1 zu Dendritischen Zellen gegeben. Zellen wurden für 14 d kokultiviert. An Tag 7 folgte eine Restimulation mit Antigen-beladenen Dendritischen Zellen und 100 U/ml IL-2.

Nach 14 d wurden die erhaltenen Zellen im IFN γ -ELISpot-Assay und für Zytotoxizitätsassays eingesetzt.

3.16 IFN γ -ELISpot-Assay

Der ELISpot-Assay ist eine Variante des Sandwich-ELISA, mit dessen Hilfe die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen bestimmt werden kann. Hierzu bietet sich die Messung der IFN γ -Freisetzung durch aktivierte T-Zellen an. Dabei werden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit zytokinspezifischen Antikörpern beschichtet. Nach Stimulation der zu untersuchenden T-Zellen mit verschiedenen Peptiden werden diese in einer Konzentration von 1×10^5 /well auf die Platte gegeben. Wurde eine T-Zelle durch Inkubation mit Peptid aktiviert, so produziert sie IFN γ , welches durch Antikörper auf der Platte gebunden wird und mittels eines sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers in einer Farbreaktion detektiert werden kann. Um jede aktivierte T-Zelle lässt sich ein Hof von gebundenem Zytokin sichtbar machen. Auf Grund der Zahl der entstandenen spots und der eingesetzten Anzahl an T-Zellen kann die Häufigkeit von IFN γ -produzierenden T-Zellen bestimmt werden.

Eine Nitrozellulose-Platte wurde mit primärem monoklonalem anti-IFN γ -Antikörper 1-D1K (10 μ g/ml verdünnt in PBS) unter sterilen Bedingungen beschichtet und für 12 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal steril mit PBS gewaschen, mit 150 μ l/well RPMI1640, welches mit 5% (v/v) autologem Serum, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin supplementiert wurde, beschickt und 1 h bei 37°C und 5% CO $_2$ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte steril dekantiert und die zu untersuchenden T-Zellen in Triplikaten in einer Konzentration von 1×10^5 /50 μ l ausgesät. Hierauf folgend wurden 4 Peptide mit folgenden Sequenzen SSDALDKIRY (HSP 90 A), ASDALDKIRY (HSP 90 B), ASEDLLKEHY (Nukleosid Diphosphatkinase A) oder FTEEEVILQY (Integrin β 1) in Konzentrationen von 10 μ M und 20 μ M zugegeben. Als Positivkontrolle diente PHA in einer Konzentration von 10 μ g/ml. Die wells wurden mit Medium auf 200 μ l aufgefüllt und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO $_2$ inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Platte sechsmal in PBS/0,1% Tween 20 gewaschen und mit monoklonalem, biotinyliertem anti-IFN γ Detektionsantikörper 7-B6-1 (1 μ g/ml verdünnt in PBS/HSA) für 2 h inkubiert. Die Platte wurde sechsmal mit PBS/Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden 100 μ l/well der Avidin-Peroxidase-Lösung

zugegeben und die Platte 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde anschließend dreimal mit PBS/Tween 20 und dreimal mit PBS gewaschen. Zur Färbung wurden 100 µl/well einer H₂O₂-aktivierten AEC-Substrat-Lösung für 4 min zugegeben und die Platte unter fließendem aqua dest. abgespült bis keine überschüssige Farbe mehr erkennbar war. Der Boden der Platte wurde abgezogen und die Platte auf Fließpapier im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die Farbreaktion beurteilt, indem die Spots am ELISpot-Reader gezählt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ImmunoSpot 3-Software.

3.17 FACS-basierter NK-Zell-Zytotoxizitätsassay

Zytotoxizität wurde mit Hilfe eines FACS-gestützten Assays gemessen. Zellen der CML-Linie K562 wurden als Zielzellen benutzt, auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen/ml Kulturmedium eingestellt, im Verhältnis 1:1 mit PKH-2 (1:500 in Diluent A verdünnt) für 5 min gefärbt, zweimal mit 10 ml Kulturmedium gewaschen und die Zellzahl auf 100000 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. 100 µl der Zellsuspension (10000 Zielzellen) wurden pro Vertiefung einer 96-well-Rundbodenplatte pipettiert und mit 1,5 µg/ml löslichem, monomerem Siglec-7 und 20 µl HBSS bei 37°C für 15 min vorinkubiert. Die Platte wurde anschließend zweimal mit HBSS + 2% FCS bei 300 x g gewaschen. Kultivierte NK-Zellen wurden durch Spülen aus den Vertiefungen der Kulturplatte gelöst, gezählt, mit Kulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und zu den Zielzellen in Effektor:Zielzellen-Verhältnissen von 5:1 und 10:1 gegeben. Assays wurden in Duplikaten oder, wenn die Zellzahl ausreichend war, in Triplikaten durchgeführt. Kontrollen bestanden aus Zielzellen alleine zur Bestimmung der Spontanlyse sowie Zielzellen, die mit löslichem Siglec-7 vorinkubiert waren. Um die Kompensation einzustellen, wurden Proben mitgeführt, die nur für die Fluoreszenz FITC oder für Propidiumjodid positiv waren. Darüber hinaus wurde ein Ansatz mit einer Doppelfärbung von FITC und Propidiumjodid analysiert. Die Proben wurden für 2 min bei 200 x g zentrifugiert, um einen engen Kontakt von Effektor- und Zielzelle zu gewährleisten und anschließend im Brutschrank für 3 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Lysierte Zellen wurden durch Zugabe von 1 µl einer 50 µg/ml Propidiumjodid-Lösung detektiert. PKH-2 positive Zellen wurden gated und der Anteil an toten, Propidiumjodid-positiven Zellen wurde bestimmt.

Wenn leukämische T-ALL Blasten als Zielzellen benutzt wurden, wurden kurz vor Versuchsbeginn kryokonservierte Aliquots dieser Zellen aufgetaut und die Zellzahl auf 100000 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Anschließend wurden die Proben analog den K562-Proben behandelt. Da es sich nicht um eine reine Blastenpopulation handelte, wurde jedoch keine PKH-2-Färbung der Zielzellen durchgeführt. Stattdessen wurde die Cokultur nach der Inkubation von 4 h mit 5 µg/ml anti-CD3-FITC oder anti-CD5-FITC in der Platte gefärbt und anschließend einmal mit HBSS + 2% FCS gewaschen. Als Effektorzellen wurden NK-Zellen verwendet, die über das NK cell isolation kit II aufgereinigt wurden, da diese kein CD5 auf der Oberfläche exprimieren. Die Ansätze wurden in FACS-Röhrchen überführt, eventuell gepoolt und sofort am FACS analysiert. Es wurde auf FITC-positive Zellen gated und der Anteil an toten Zellen durch Propidiumjodid-Färbung detektiert.

3.18 FACS-basierter T-Zell-Zytotoxizitätsassay

T-Zell-Zytotoxizitätsassays wurden analog zu NK-Zell-Zytotoxizitätsassays mit K562 durchgeführt. Hierbei wurden Neuroblastomlinien durch Behandlung mit Trypsin gelöst, mit PKH-2 angefärbt und in verschiedenen Effektor:Zielzell-Verhältnissen mit antigenspezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten (s. 3.15) inkubiert. Als Kontrolle wurden T-Zellen mitgeführt, die mit Dendritischen Zellen ohne Zugabe von Peptid kultiviert wurden. Die Analyse erfolgte ebenfalls am Durchflusszytometer, wobei tote Zellen durch Färbung mit Propidiumjodid detektiert wurden.

3.19 Glycanarray

Glycanarrays wurden mit Hilfe des Qproteome Glycoprofiling Field-Test Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ziel des Arrays ist es, Glykosylierungsmuster von Zelloberflächenproteinen verschiedener Proben vergleichen zu können. Hierzu werden Glykoproteine isoliert, biotinyliert und anschließend auf einem Glycanarray inkubiert. Auf die Oberfläche des Arrays sind Lektine unterschiedlicher Selektivität in verschiedenen Konzentrationen gebunden. Biotinylierte Glykoproteine, die an Lektine auf dem Array binden, können nach Inkubation mit Cy[®]3-markiertem Streptavidin mit Hilfe eines Microarray Scanners detektiert werden.

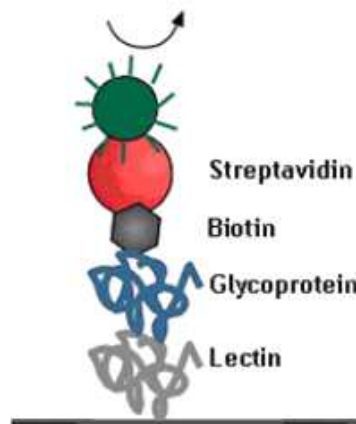


Abb. 3.2: Prinzip des Glykanarrays, aus: Qproteome Glycoprofiling Field Test Handbook, 2006, Qiagen.

Insgesamt wurden sechs Versuchsansätze durchgeführt. K562- und CEM-Zellen wurden als Zellsuspension aus Kultur entnommen, T-Zellen, B-Zellen sowie T-ALL-Blasten und cALL-Blasten wurden durch immunomagnetische Sortierung aufgereinigt. Hierzu wurden 120×10^6 PBMCs eines gesunden Spenders durch Dichtegradientenzentrifugation aus peripherenvenösem Blut gewonnen und zu gleichen Teilen auf zwei Ansätze verteilt. Der erste Ansatz wurde mit $60 \mu\text{l}$ anti-CD3-PE-Antikörper, der zweite Ansatz mit $60 \mu\text{l}$ anti-CD19-PE-Antikörper in $100 \mu\text{l}$ MACS-Puffer/ 10^7 Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Darüber hinaus wurden 25×10^6 T-ALL- und 20×10^6 cALL-Blasten aufgetaut und in RPMI1640 Medium mit 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und $100 \mu\text{g/ml}$ Streptomycin aufgenommen. T-ALL-Blasten wurden mit $20 \mu\text{l}$ anti-CD3-PE-Antikörper in $100 \mu\text{l}$ MACS-Puffer/ 10^7 Zellen, cALL-Blasten mit $20 \mu\text{l}$ anti-CD10-PE-Antikörper in $100 \mu\text{l}$ MACS-Puffer/ 10^7 Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit MACS-Puffer wurde das Pellet aller vier Ansätze jeweils in $80 \mu\text{l}$ MACS-Puffer/ 10^7 Zellen gelöst und mit $15 \mu\text{l}$ anti-PE MicroBeads/ 10^7 Zellen für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal gewaschen, das jeweilige Pellet in $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer gelöst und die Zellsuspension mit Hilfe einer LS-Säule nach Angaben des Herstellers immunomagnetisch sortiert. Die Reinheit der erhaltenen Zellen wurde am Durchflusszytometer durch Färbung mit anti-CD3 bzw. anti-CD19-Antikörpern nach unter 3.12 beschriebenem Protokoll bestimmt. Die erhaltenen Zellen wurden entsprechend dem Protokoll des Qproteome Glycoprofiling Field-Test Kits weiterbehandelt. Um nicht die komplette Membranfraktion, sondern lediglich die

Proteine auf der Zelloberfläche zu extrahieren und zu biotinylieren, wurde eine Markierung mit nicht-permeablem Sulfo-NHS-Biotin durchgeführt. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen mit 1,5 mg Sulfo-NHS-Biotin in PBS (+ 0,5 mM CaCl_2 , MgCl_2) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (+ 0,5 mM CaCl_2 , MgCl_2) wurden die Zellen in 2 ml 0,1 M Glycin resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Zur Fraktionierung wurden die Zellen in 1 ml Extraktionspuffer CE1 für 10 min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Das resultierende Lysat wurde bei 1000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthält, abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml Extraktionspuffer CE2 für 30 min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert und die Suspension anschließend bei 6000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand, der die Membranfraktion enthält, wurde abgenommen und gegen Dialysierlösung im Slide-A-Lyzer System bei 4°C dialysiert. Nach 1 h wurde die Dialysierlösung erneuert und die Dialyse für weitere 36 h fortgesetzt. Nach der Dialyse wurde eine Protein-Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Micro BCA™ Protein Assay Kits (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Inkubation der Array-Objektträger wurden diese zunächst für 60 min bei Raumtemperatur in einer Petrischale auf dem Schüttler mit 25 ml Blockierlösung inkubiert und anschließend dreimal mit je 25 ml Waschlösung für 5 min gewaschen. Die dialysierte Proteinprobe sowie das Cy[®]3-markierte Streptavidin wurden je auf eine Konzentration von 5 µg/ml eingestellt, mit 22,5 µl Blockierlösung versetzt und auf ein Endvolumen von 450 µl mit Waschlösung aufgefüllt. Die Membran des Objektträgers wurde anschließend mit 450 µl Proteinprobe für 60 min im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 25 ml Waschlösung für 5 min wurde die Membran mit 450 µl vorbereiteter Streptavidin-Lösung für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal mit 25 ml Waschlösung für 5 min und einmal mit 25 ml Wasser (Ampuwa) für 1 min gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet bis die Membran komplett weiss erschien. Getrocknete Objektträger, die mit K562- oder CEM-Lysat inkubiert wurden, wurden zur Firma Qiagen geschickt und dort gescannt. Alternativ dazu wurden Objektträger, die mit Lysat aus den vier gemachten Ansätzen inkubiert wurden, am Scanner (Perkin Elmer Pro Scan Array; Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Brock) bei 543 nm und einer Auflösung von 20 µm

gemessen. Während des Scanvorgangs wurde versucht, die Werte für Lektinspots ≤ 55000 und die Hintergrundwerte ≤ 10000 zu halten. Die positiven Kontrollspots auf dem Array wurden in die Sättigung gebracht. Um die Proben vergleichen zu können, wurde darauf geachtet, dass die Objektträger unter den gleichen Einstellungen gescannt wurden. Auf Grund eines Softwareproblems erfolgte die Auswertung der Daten durch die Firma Qiagen mit Hilfe der Qproteome™ GlycoAnalyzer – Software in Hilden.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von rekombinant hergestellten Siglec-Fusionsproteinen das Sialylierungsmuster maligner Zellen näher charakterisiert und die funktionelle Bedeutung der Sialinsäuren als Liganden von Siglecs für Strategien des Tumors, einem Angriff des Immunsystems zu entgehen, näher untersucht.

4.1 Plasmid Design und Klonierung von Siglec-Fusionsproteinen

Siglecs spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten. Welche Funktion jedoch ihren Liganden zukommt, ist bisher nur wenig analysiert worden.

Um das Glykosylierungsmuster maligner Zellen näher zu untersuchen, konzentrierten sich die Versuche auf Analysen mit Sialinsäure-bindenden Lektinen. Hierbei wurde besonders die Expression von Liganden für zwei humane Sialinsäure-bindende Lektine, Siglec-7 und Siglec-9, untersucht, da diese Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zell-Subpopulationen und NK-Zellen zu finden sind. Die N-terminale V-Typ-Domäne und je zwei C2-Typ-Domänen von Siglec-7 und Siglec-9, wurden durch RT-PCR aus mRNA Dendritischer Zellen kloniert. Durch Klonierung der extrazellulären Domäne nicht aber der hydrophoben Transmembrandomäne sind die Produkte gut wasserlöslich. Das neu synthetisierte Protein kann sezerniert werden und so aus dem Zellkulturmedium mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Carboxyterminal liegt ein aus sechs Histidinen bestehender His-Tag, der eine Aufreinigung über Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA-Agarose erlaubt. Histidin geht dabei eine Chelatbindung mit Nickel ein. Eine Detektion des Proteins wurde mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper in Western-Blot Analysen ermöglicht.

Eine Detektion der rekombinanten Siglec-Fusionsproteine erwies sich als schwierig. Aus diesem Grund wurde eine Biotinylierungszielsequenz in das Plasmid eingeführt, um eine spätere Oligomerisierung des Proteins mittels Streptavidin-(R)-Phycoerythrin zu ermöglichen. Die Klonierung wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

Abb. 4.1 zeigt schematisch die Struktur der Fusionsproteine.

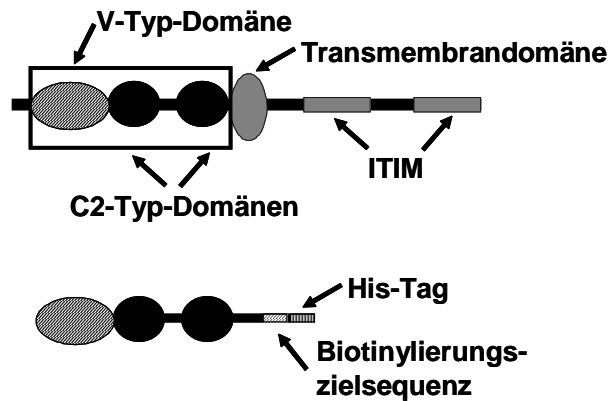


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Siglec-Fusionsproteine.

Da Siglecs selber glykosyliert werden müssen, wurden die Proteine in eukaryontischen Zellen exprimiert. Glykosylierung spielt für die Spezifität und korrekte Faltung der Proteine eine Rolle. Hierzu wurden 293T-Zellen mit Plasmid, das für Siglec-7 bzw. Siglec-9 kodiert, mittels Calciumphosphatpräzipitation transfiziert. Siglec-7 bzw. Siglec-9 wurden aus dem Überstand von transfizierten 293T-Zellen aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels Western Blot-Analysen detektiert. Abb. 4.2 zeigt einen Western Blot, bei dem die Proteine durch Inkubation mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen wurden. Es sind Banden auf der erwarteten Höhe zu finden. Siglec-7 weist ein errechnetes, unglykosyliertes Molekulargewicht von 40,2 kDa, Siglec-9 von 40,6 kDa auf. Da die Proteine jedoch noch glykosyliert werden, laufen die Banden in Höhe von ca. 60 kDa. Nach Behandlung mit PNGase F konnte das deglykosylierte Fusionsprotein mit Hilfe des anti-Siglec-7 Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 4.2).

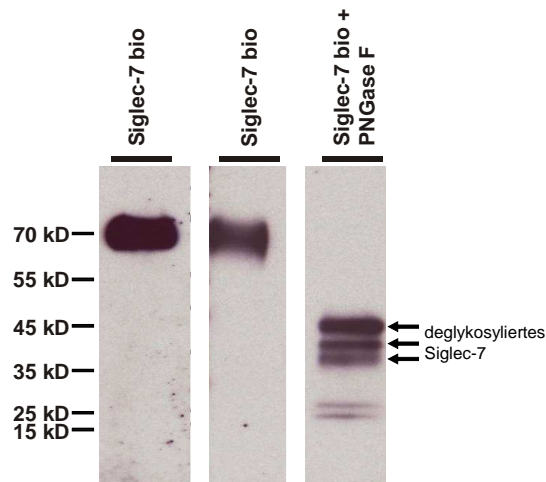


Abb. 4.2: Detektion des Siglec-7-Fusionsproteins. Biotinyliertes Siglec-7 wurde im Western Blot durch Inkubation mit SA-HRP (Spur 1) oder biotinyliertem anti-Siglec-7 Antikörper und SA-HRP als Sekundäntikörper (Spur 2 und 3) nachgewiesen. Nach Behandlung mit PNGase F zeigten sich Banden des deglykosylierten Proteins.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein BCA-Assay der aufgereinigten Fusionsproteine durchgeführt. Da Albuminreste in der Probe jedoch die Messung beeinflussten, wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine Coomassiefärbung des Gels durchgeführt und die resultierenden Banden gegen einen mitgeführten Albuminstandard abgeschätzt. Im Durchschnitt konnten 3 μg Siglec-7 bzw. Siglec-9 / 162 cm^2 Zellkulturflasche aufgereinigt werden.

4.2 Oligomerisierung der Siglec-Fusionsproteine

Oberflächenfärbungen von PBMC mit monomerem Siglec-7-Fusionsprotein zeigten in durchflusszytometrischen Analysen kaum detektierbare Bindung. Lektine weisen typischerweise Affinitätskonstanten auf, die im millimolaren Bereich liegen (Weis und Drickamer, 1996). Siglecs gehen nur schwache Interaktionen mit terminalen Monosacchariden ein. Hochaffine Zelladhäsionen werden erst durch multivalente Interaktionen zwischen Lektinen und Karbohydraten auf benachbarten Zellen gewährleistet. Die Affinität von Sialosiden zu Sialoadhesin wurde mittels NMR analysiert. Resonanzshifts wurden benutzt, um Bindungskonstanten in Lösung zu bestimmen und die Affinitäten von Sialoadhesin zu natürlichen und in ihrer Struktur

veränderten Liganden zu vergleichen. Die durchschnittlichen K_D -Werte lagen bei 3 mM (Crocker et al., 1999). Auf Grund der geringen Affinität zwischen einem einzelnen Glykan und Lektin, wurden die rekombinanten Fusionsproteine Siglec-7 und Siglec-9 oligomerisiert, um die Avidität zu erhöhen. Durch Einfügen einer Biotinylierungszielsequenz konnten rekombinante Proteine durch Inkubation mit 2,5 μ g Biotin-Protein-Ligase BirA 500 pro 10 nmol Protein enzymatisch biotinyliert werden. Die erfolgreiche Biotinylierung wurde im Western Blot durch Detektion mit SA-HRP bestätigt (Abb. 4.2). Durch Zugabe von Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin, welches vier Bindungsstellen für Biotin aufweist, wurden die biotinylierten Fusionsproteine tetramerisiert. Durch diese Strategie wurde eine Nutzung der Siglec-Fusionsproteine in Analogie zu MHC-Tetrameren in durchflusszytometrischen Analysen ermöglicht.

Abb. 4.3 verdeutlicht den Unterschied zwischen Färbungen mit monomerem und mit tetramerem Siglec-Fusionsprotein. Es zeigt sich, dass das Tetramer [Siglec-7]₄ : SA-PE eine deutlich höhere Bindung aufweist als das Monomer und so eine intensivere Fluoreszenz und reproduzierbare Färbungen in durchflusszytometrischen Analysen bewirkt. Die Bindung ist Sialinsäure-abhängig wie durch Behandlung der Zellen mit Neuraminidase bestätigt werden konnte. Zur Färbung von Ansätzen, die im Durchflusszytometer gemessen wurden, wurde daher in folgenden Versuchen mit dem Tetramer weitergearbeitet. Um optimale Färbungen zu ermöglichen, wurde die einzusetzende Konzentration an [Siglec-7]₄ : SA-PE in einer Titrationsreihe bestimmt. Diese wurde nach jeder Aufreinigung durchgeführt, da sich die Konzentrationen an aufgereinigtem Siglec-Fusionsprotein unterschieden. Für durchflusszytometrische Analysen wurde 1 μ g/ml an [Siglec-7]₄ : SA-PE eingesetzt.

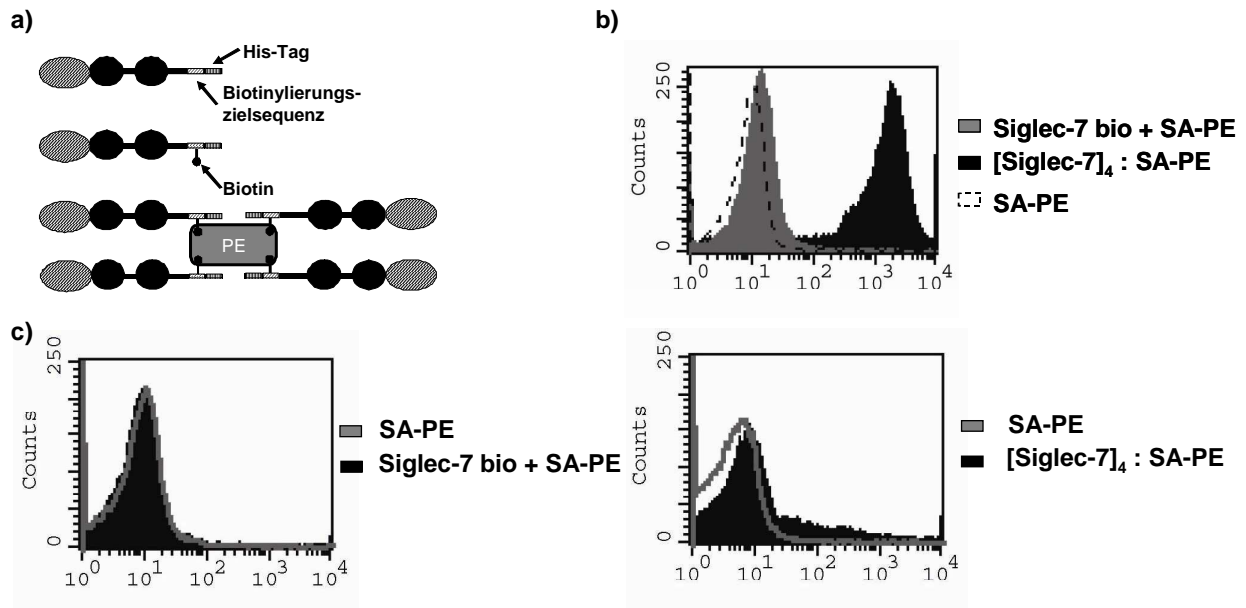


Abb. 4.3: Oligomerisierung der Siglec-Fusionsproteine. a) Um die Avidität zu erhöhen, wurden die Fusionsproteine biotinyliert und durch Zugabe von Streptavidin-(R)-Phycoerythrin tetramerisiert. b) Durchflusszytometrische Analysen von PBMC zeigen, dass monomeres Siglec-7 eine geringere Bindung an seine Liganden aufweist als tetrameres Siglec-7. Als Kontrolle wurde SA-PE eingesetzt. c) Nach Behandlung mit Neuraminidase ist keine Bindung von monomerem oder tetramerem Siglec-7 mehr detektierbar.

4.3 Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 werden auf PBMC exprimiert

Die Expression von Liganden für Siglec-7 wurde durch Färbungen mit tetramerisiertem Siglec-Fusionsprotein auf Zellen des Immunsystems analysiert (Abb. 4.4 a). Es konnte eine differentielle Expression auf physiologischen Lymphozyten aus peripherem Blut festgestellt werden. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie Monozyten und NK-Zellen wiesen den Liganden für Siglec-7 auf. B-Zellen hingegen konnten in eine [Siglec-7]₄ : SA-PE positive und negative Population unterteilt werden. Die Expression an Siglec-7-Liganden auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten blieb nach Aktivierung der Zellen über 48 h mit 100 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 unverändert (ohne Abb.). Die Expression von Liganden für Siglec-9 konnte nur auf CD14⁺ Monozyten und geringfügig auf Subpopulationen von T-Lymphozyten und NK-Zellen detektiert werden (Abb. 4.4 c). Um zu bestätigen, dass die Bindung Sialinsäure-abhängig ist, wurden PBMC mit Neuraminidase behandelt. Durchflusszytometrische Analysen mit [Siglec-7]₄ : SA-PE ergaben keine Detektion des Liganden auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie B-Zellen und NK-Zellen. Monozyten zeigten eine reduzierte Expression des Liganden (Abb. 4.4 b).

Ergebnisse

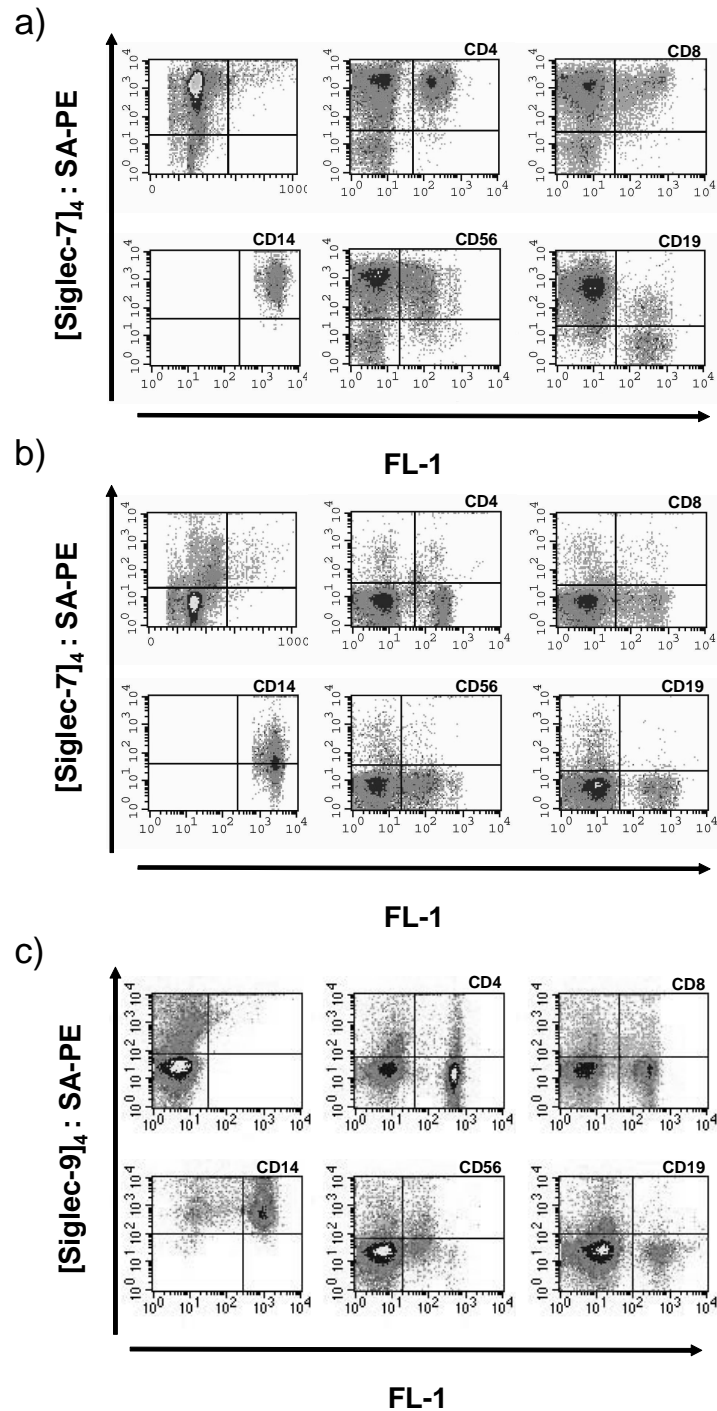


Abb. 4.4: Expression von Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 auf PBMC gesunder Spender. Dargestellt ist die Analyse von PBMC insgesamt und von Subpopulationen, die durch Gegenfärbung mit den angegebenen Antikörpern detektiert wurden. Durchflusszytometrische Analysen mit a) tetramerem Siglec-7 : SA-PE ergaben eine Expression von Liganden auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie auf Monozyten und NK-Zellen. B-Zellen hingegen zeigten eine [Siglec-7]₄ : SA-PE positive und negative Population. b) Nach Behandlung mit Neuraminidase nahm die Bindung von [Siglec-7]₄ : SA-PE ab. c) Eine Bindung von Siglec-9 : SA-PE konnte auf Monozyten und geringfügig auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie auf NK-Zellen detektiert werden.

4.4 Analyse der B-Zell-Subpopulationen

Der Anteil an B-Lymphozyten im Peripherblut bei Erwachsenen beträgt 6-19%. B-Zellen zeigten nach Färbung mit [Siglec-7]₄ : SA-PE eine positive und eine negative Population. Der Anteil der für [Siglec-7]₄ : SA-PE positiven Population war dabei spenderabhängig und bewegte sich zwischen 31,3% und 72,8% der CD19⁺ Lymphozyten (n=7) (Abb. 4.5).

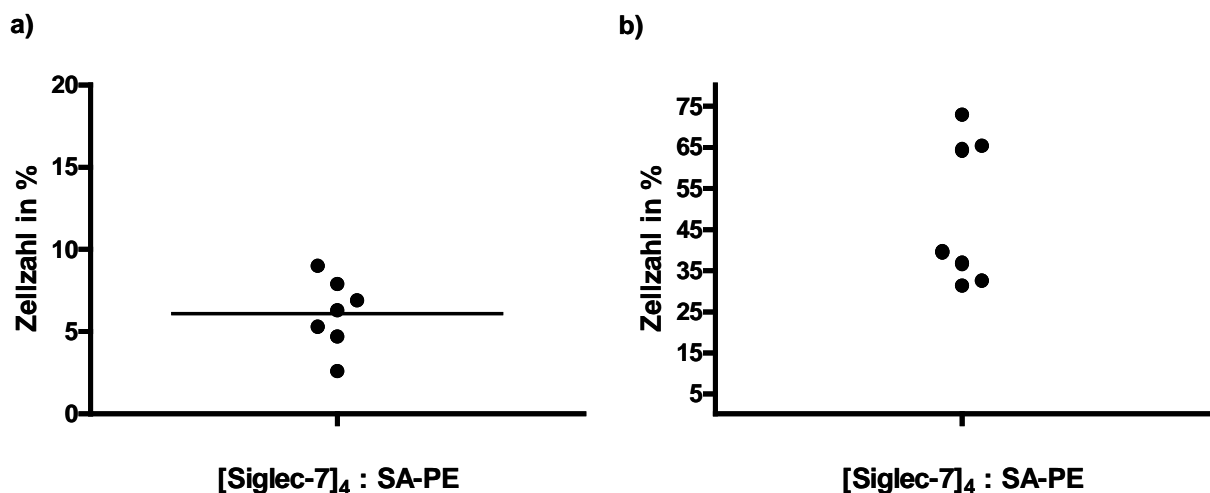


Abb. 4.5: Expression von Siglec-7-Liganden auf B-Zellen von 7 verschiedenen Spendern. Dargestellt ist a) der prozentuale Anteil CD19⁺ und [Siglec-7]₄ : SA-PE⁺ B-Zellen an der PBMC-Population und b) der Anteil [Siglec-7]₄ : SA-PE⁺ B-Zellen bezogen auf die Anzahl an B-Zellen der einzelnen Spender.

Um zu analysieren, ob bestimmte B-Zell-Subpopulationen die Liganden für Siglec-7 tragen, wurden die Zellen mit verschiedenen Markern (Tab. 4.1) gegengefärbt.

Tab. 4.1: Oberflächenantigene, die zur Charakterisierung der einzelnen B-Zellsubpopulationen in durchflusszytometrischen Analysen verwendet wurden.

Subpopulation der B-Lymphozyten	Marker
Naive B-Lymphozyten	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD27 ⁻
Aktivierte B-Lymphozyten	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD25 ⁺ , CD69 ⁺
Plasmazellen	CD19 ⁺ , CD27 ⁺ , CD38 ⁺ , CD138 ⁺
Gedächtnis-B-Lymphozyten	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD27 ⁺

Abb. 4.6 stellt zunächst die Färbung dar, bei der CD19⁺ Zellen angefärbt und mit den angeführten Markern gegengefärbt wurden. Es zeigt sich, dass keine einheitlich

Ergebnisse

Siglec-7-negative Zellpopulation detektiert werden kann. Naive B-Zellen, die in der Peripherie noch kein Antigen getroffen haben, sowie Plasmazellen zeigen zwei Populationen. Aktivierte B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen hingegen sind einheitlich positiv für den Siglec-7 Liganden. Entsprechende Ergebnisse wurden auch erhalten, wenn zunächst die einzelnen B-Zell-Subpopulationen angefärbt und anschließend die Färbung dieser Zellen mit Siglec-7-Tetrameren dargestellt wurde (Abb. 4.7).

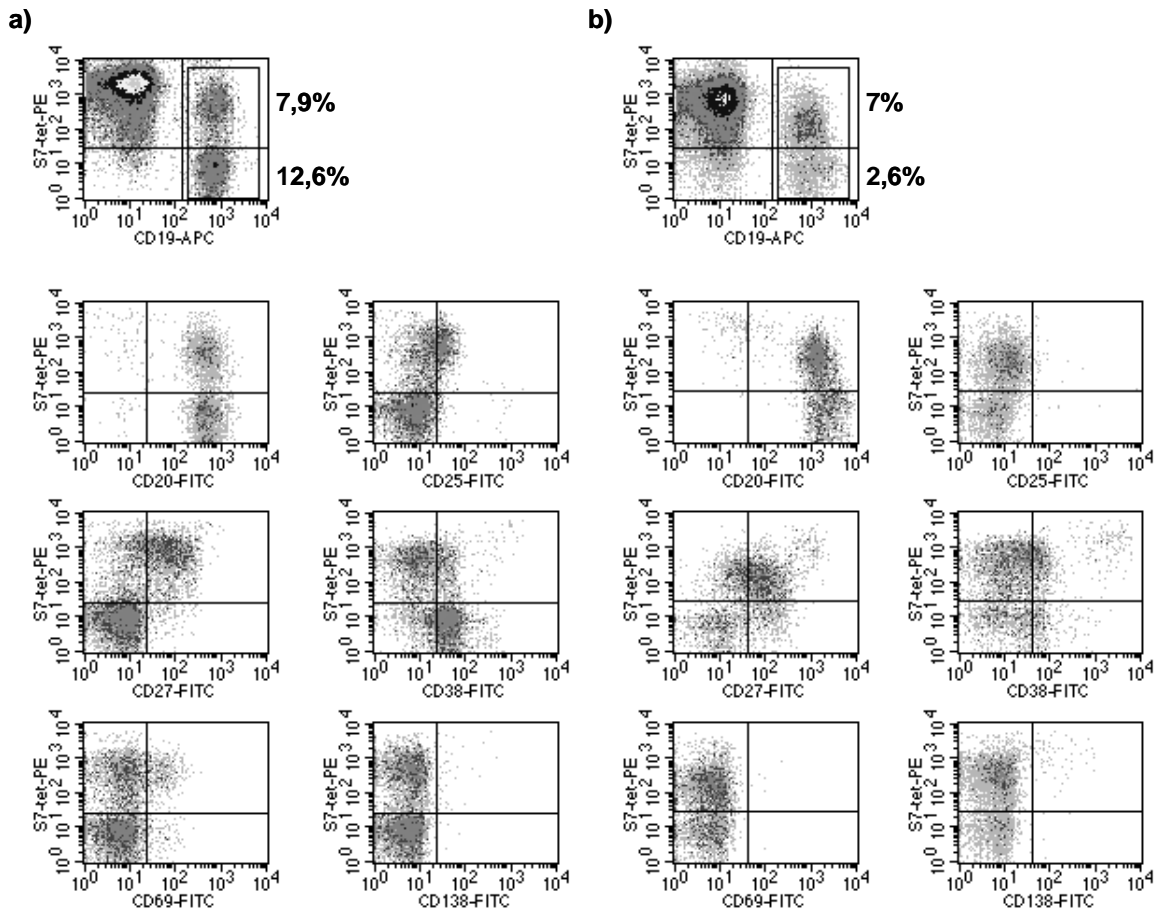


Abb. 4.6: Durchflusszytometrische Analyse von B-Zellsubpopulationen. PBMC von zwei gesunden Spendern wurden mit tetramerem Siglec-7 : SA-PE gefärbt. CD19⁺ Zellen von a) Spender 1 und b) Spender 2 wurden gefärbt und B-Zell-Subpopulationen durch Färbung mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Ergebnisse

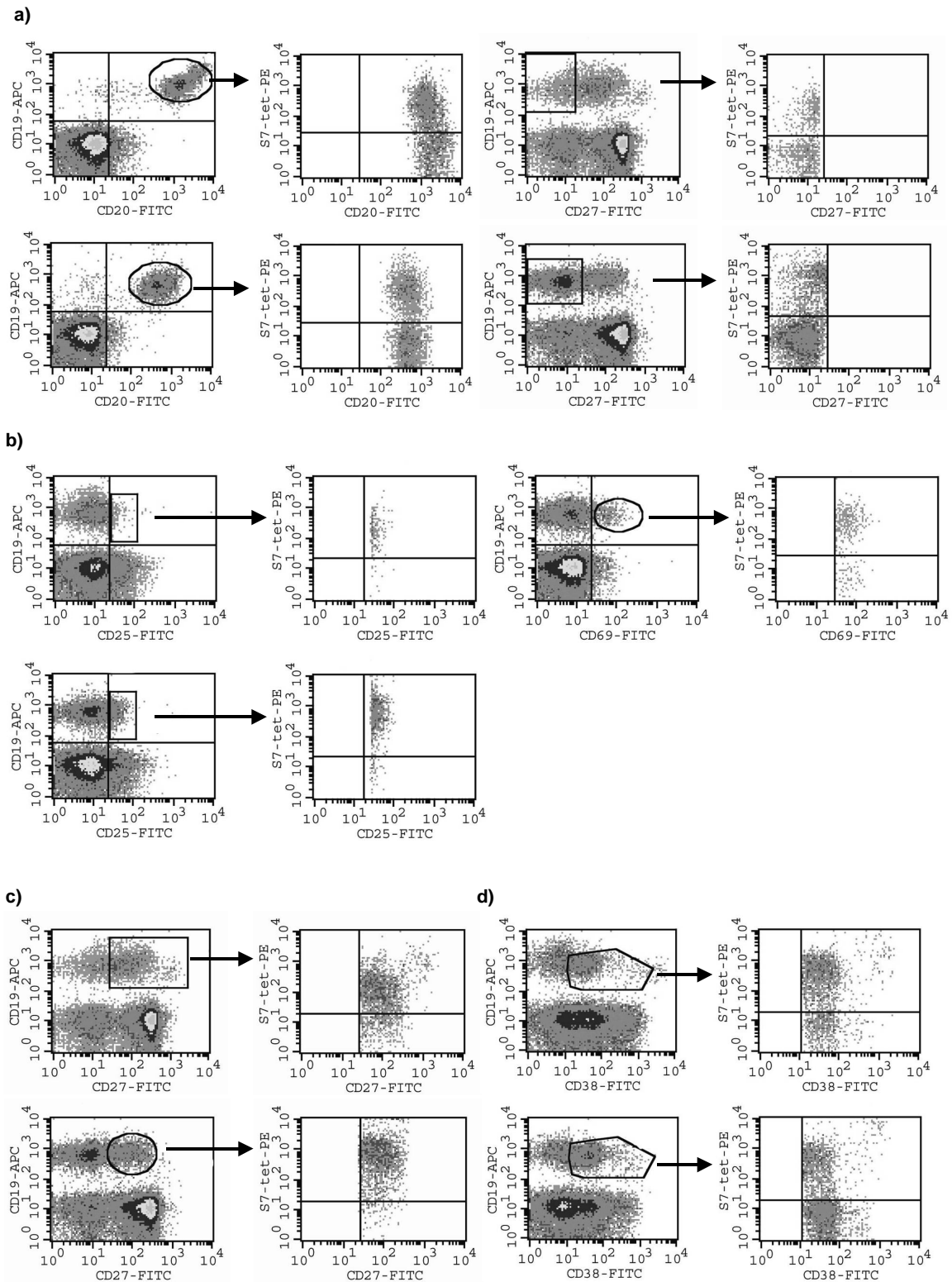


Abb. 4.7: Expression von Siglec-7 Liganden auf B-Zell-Subpopulationen a) naive B-Zellen, b) aktivierte B-Zellen, c) Gedächtnis-B-Zellen, d) Plasmazellen. Dargestellt sind die Ergebnisse von Zellen zweier Spender. Der rechte Plot zeigt jeweils die Gegenfärbung mit [Siglec-7]₄ : SA-PE der im angezeigten Gate des linken Plots liegenden Zellen.

4.5 Expression von Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 auf MNC des Thymus

Um die Verteilung von Siglec-7 Liganden auf Lymphozyten verschiedener lymphatischer Organe zu untersuchen, wurden Thymozyten, die aus OP-Präparaten gewonnen wurden, auf Expression von Siglec-7 Liganden hin analysiert (n=2). Eine Bindung des Siglec-7-Tetramers konnte detektiert werden. Diese erwies sich als spezifisch, sie ließ sich durch Präinkubation mit humanem Polyglobin nicht antagonisieren. Nach Denaturierung des Tetramers bei 56°C für 3 h konnte keine Bindung mehr detektiert werden (Abb. 4.8 c). Auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten zeigte sich eine heterogene Expression des Liganden für Siglec-7

Abb. 4.9). 55% der CD45⁺ Leukozyten, 37% der CD4⁺ und 59% der CD8⁺ T-Lymphozyten zeigten eine Expression des Liganden für Siglec-7. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für Färbungen mit [Siglec-9]₄: SA-PE. Die Bindung war insgesamt schwächer als bei Färbungen mit Siglec-7-Tetrameren. 8,4% der CD45⁺ Leukozyten, 10,5% der CD4⁺ und 6,6% der CD8⁺ T-Lymphozyten zeigten eine Expression des Liganden für Siglec-9.

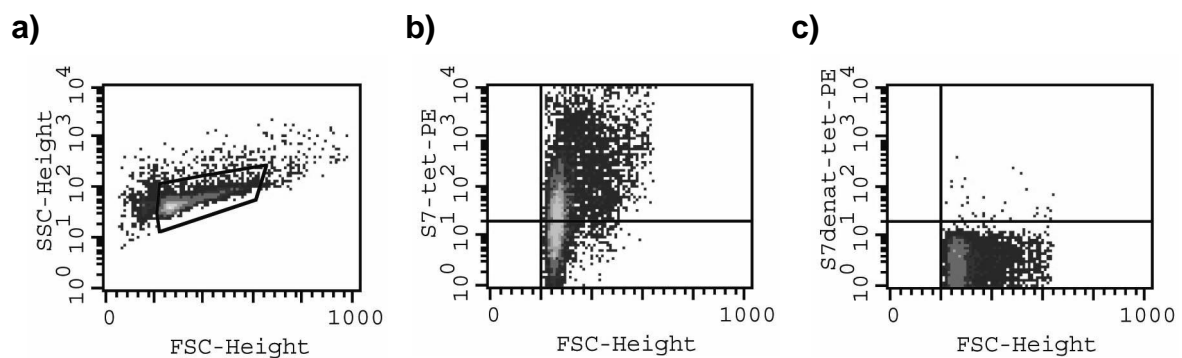


Abb. 4.8: Färbung von a) Thymozyten mit b) [Siglec-7]₄: SA-PE. c) Nach Denaturierung des Tetramers für 3 h bei 56°C ist keine Bindung mehr detektierbar.

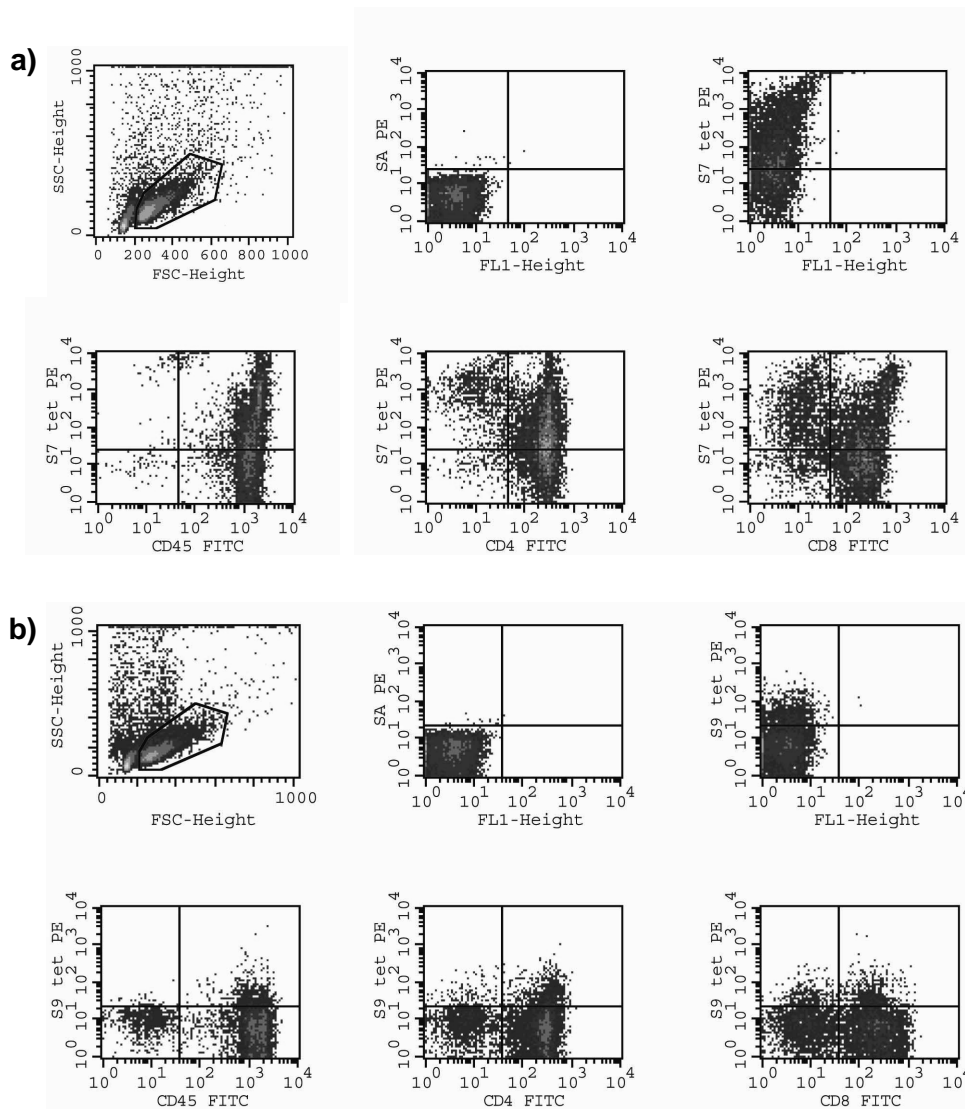


Abb. 4.9: Färbung von MNC des Thymus mit a) [Siglec-7]₄: SA-PE oder b) [Siglec-9]₄: SA-PE. Gegenfärbungen mit anti-CD45 als Marker für hämatologische Zellen sowie anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern zur Detektion von T-Lymphozyten sind dargestellt.

4.6 Expression von Siglec-7 Liganden auf MNC des Lymphknotens

Expression von Siglec-7 Liganden wurde auf Lymphozyten aus überschüssigem Material von Lymphknotenexstirpationen untersucht. Leukozyten wurden durch Färbung mit CD45 von nicht-hämatopoetischen Zellen unterschieden. Durchflusszytometrische Analysen Propidiumjodid-negativer Zellen mit [Siglec-7]₄: SA-PE ergaben eine positive und eine negative Population.

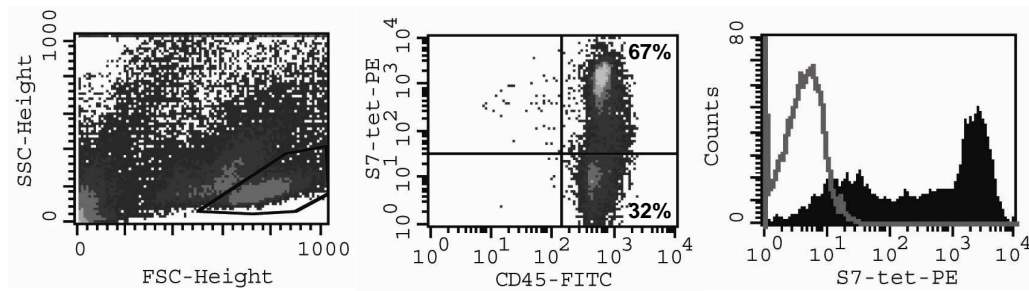


Abb. 4.10: Expression von Liganden für Siglec-7 auf Zellen eines OP-Präparates des Lymphknotens. Propidiumjodid-positive Zellen wurden elektronisch herausgated, hämatologische Zellen durch Färbung mit Antikörpern gegen CD45 detektiert und mit [Siglec-7]₄ : SA-PE gegengefärbt.

4.7 Untersuchung des Glykosylierungsmusters tolerogener Zellen

Sialylierungsprozesse sind an der Immunregulation beteiligt. Um ihre Funktion bei der Toleranzinduktion zu klären, wurde untersucht, ob tolerogene Zellen sialylierte Liganden exprimieren, die mit inhibitorischen Siglecs auf der Oberfläche von Effektorzellen interagieren könnten.

4.7.1 Sialylierung regulatorischer T-Zellen

Zunächst wurden CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Lymphozyten analysiert. Vorarbeiten haben gezeigt, dass isolierte CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen eine Population mit niedriger und eine Population mit hoher Dichte an α 2,6-verknüpfter Sialinsäure aufweisen. Während der Kultivierung der Zellen nahm die Dichte an α 2,6-verknüpfter Sialinsäure zu (Jenner et al., 2006).

Regulatorische T-Lymphozyten wurden durch immunomagnetische Sortierung gewonnen und durch die Expression der Marker CD4 und CD25 charakterisiert. Durchflusszytometrische Analysen der Zellen mit Hilfe von [Siglec-7]₄ : SA-PE ergaben eine Expression der Liganden für Siglec-7. Eine Expression von Siglec-9 Liganden konnte nicht detektiert werden (Abb. 4.11). Dies zeigte sich bei mehreren Spendern (n=4). Eine funktionelle Charakterisierung gelang auf Grund der geringen Zellzahlen nicht.

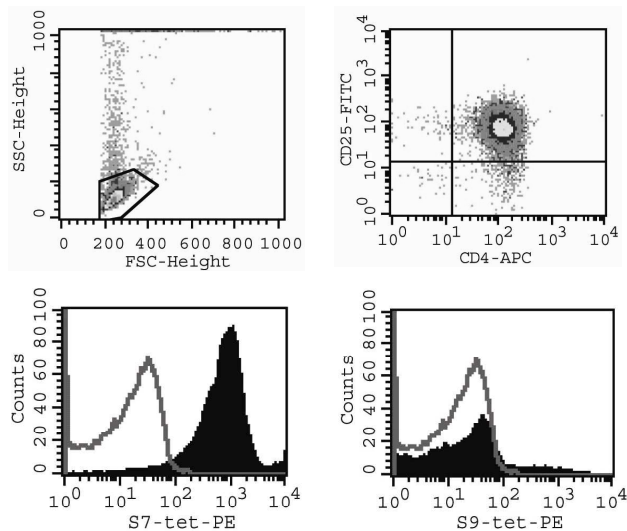


Abb. 4.11: Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Lymphozyten. $CD4^+CD25^+$ Zellen wurden durch immunomagnetische Sortierung aufgereinigt und mit $[Siglec-7]_4 : SA-PE$ bzw. $[Siglec-9]_4 : SA-PE$ gefärbt.

4.7.2 Sialylierung Monozyten-abgeleiteter Dendritischer Zellen

Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Sialylierungsmuster Dendritischer Zellen mit pflanzlichen Lektinen haben ergeben, dass tolerogene, unreife Dendritische Zellen eine hohe Dichte an $\alpha 2,6$ -Sialinsäuren auf der Oberfläche aufweisen. Nach Reifung der Dendritischen Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen wurde die Expression von $\alpha 2,6$ -Sialinsäuren herunterreguliert (Jenner et al., 2006). Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Vermutung ableiten, dass tolerogene Zellen Glykane aufweisen, welche als Liganden für inhibitorische Siglecs auf der Oberfläche von Effektorzellen dienen könnten. Da durch Färbungen mit pflanzlichen Lektinen nicht notwendigerweise Aussagen über Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 getroffen werden können, wurden Färbungen mit rekombinantem $[Siglec-7]_4 : SA-PE$ und $[Siglec-9]_4 : SA-PE$ durchgeführt.

Zur Generierung Dendritischer Zellen wurden Monozyten aus PBMC durch immunomagnetische Sortierung mittels CD14-Microbeads isoliert.

Jeweils an den Tagen 0, 2 und 4 wurden die gewonnenen Monozyten mit IL-4 und GM-CSF versetzt. An Tag 5 wurde ein Teil der Kultur für 48 Stunden mit einem Reifungscocktail bestehend aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, IL- 1β , TNF- α und PGE $_2$ versetzt. Abb. 4.13 zeigt die Expression von CD14, HLA-DR und CD83 am Tag der Isolation, sowie nach 5 und 7 Tagen. Während die Expression von

CD14 im Verlauf der Reifung abnahm, konnte eine verstärkte Expression der Reifungsmarker CD83 und HLA-DR detektiert werden (n=7).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten mRNA für Siglec-7 und Siglec-9 in unreifen und reifen Dendritischen Zellen mittels PCR nachweisen. Durchflusszytometrische Analysen mit Antikörpern, die die inhibitorischen Rezeptoren Siglec-7 und Siglec-9 erkennen, konnten diese Ergebnisse auf Proteinebene bestätigen und ergaben eine Expression beider Rezeptoren sowohl auf unreifen als auch auf reifen Dendritischen Zellen (Abb. 4.12).

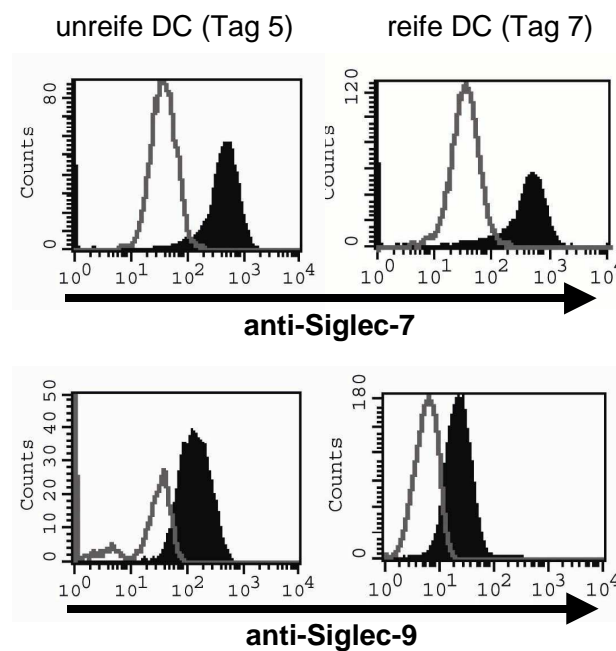


Abb. 4.12: Expression von Siglec-7 und Siglec-9 auf unreifen und reifen Dendritischen Zellen (DC). Die Zellen wurden an Tag 5 und Tag 7 nach Isolation mit anti-Siglec-7 Antikörper und Streptavidin-PE bzw. anti-Siglec-9-FITC gefärbt (schwarz), Streptavidin-PE bzw. IgG-FITC wurden als Negativkontrollen benutzt (grau).

Bezüglich der Liganden für beide Rezeptoren zeigten sich nach Färbung mit [Siglec-7]₄:SA-PE bei unreifen Dendritischen Zellen zwei Populationen. Reife Dendritische Zellen zeichneten sich durch eine einheitliche Färbung mit [Siglec-7]₄:SA-PE aus. Insgesamt konnte nach Reifung eine Abnahme der Expression an Siglec-7 Liganden detektiert werden. Analysen mit [Siglec-9]₄:SA-PE ergaben eine Expression der entsprechenden Liganden. Jedoch war diese schwächer als nach Färbung mit [Siglec-7]₄:SA-PE.

Ergebnisse

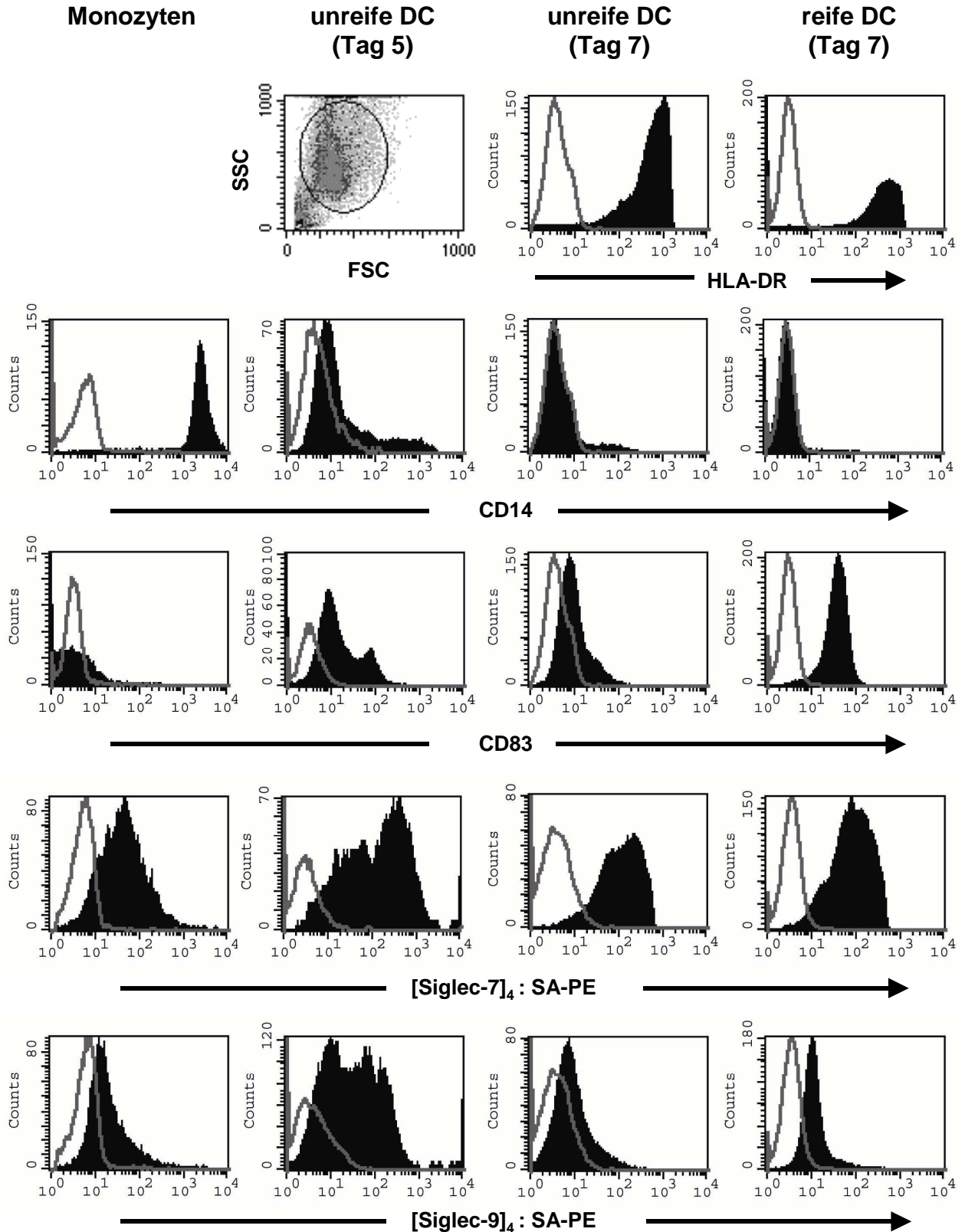
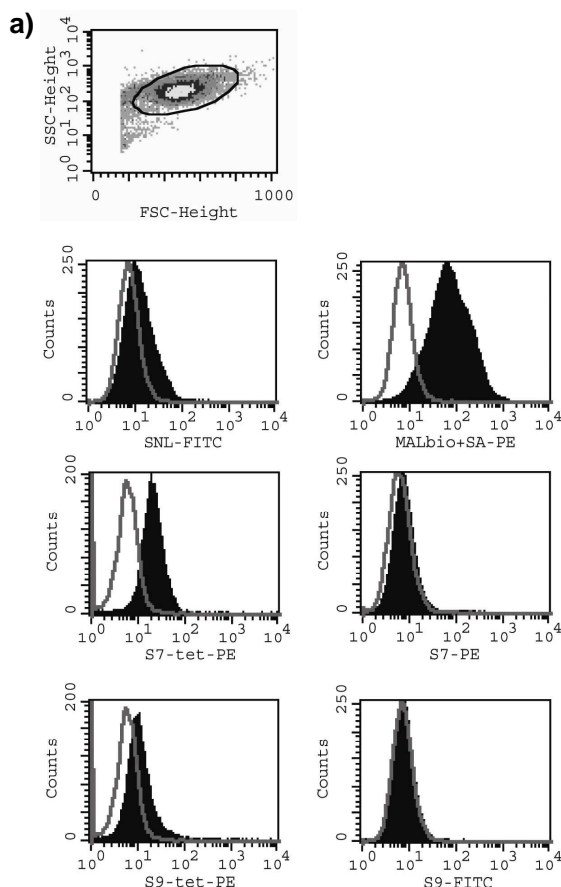


Abb. 4.13: Vergleich der Expression von Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 auf Monozyten, unreifen Dendritischen Zellen an Tag 5 und Tag 7 sowie gereiften Dendritischen Zellen an Tag 7 nach Isolation. Die Zellen wurden durch die Marker HLA-DR, CD14 und CD83 charakterisiert und mit [Siglec-7]₄ : SA-PE bzw. [Siglec-9]₄ : SA-PE gefärbt.

4.7.3 Glykosylierung Multipotenter mesenchymaler Stromazellen

Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) sind in der Lage, eine suppressive Wirkung auf T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen auszuüben. Inwieweit deren Glykosylierungsmuster an der Vermittlung dieses Effektes beteiligt ist, ist bisher ungeklärt. Um Aussagen über die Expression von Siglecs und ihrer Liganden auf MSC als immunregulatorischen Zellen treffen zu können, wurden Färbungen mit den pflanzlichen Lektinen Sambucus nigra Lektin (SNL), das α 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste erkennt, und Maackia amurensis Lektin (MAL), welches α 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste erkennt, durchgeführt. α 2,3-Sialinsäuren werden auf der Zelloberfläche von MSC exprimiert, α 2,6-Sialinsäuren hingegen konnten nur schwach detektiert werden. Expression der inhibitorischen Rezeptoren Siglec-7 und Siglec-9 wurde mit entsprechenden Antikörpern nicht gezeigt. Jedoch ergaben Färbungen mit [Siglec-7]₄ : SA-PE eine Expression von Liganden für Siglec-7 auf der Oberfläche von MSC. Für [Siglec-9]₄ : SA-PE konnte nur eine schwache Bindung detektiert werden (Abb. 4.14 a). Dieses Expressionsmuster blieb für Siglec-7 Liganden auch nach Aktivierung der Zellen mit IFN γ erhalten, für Siglec-9 Liganden liegen diesbezüglich keine Daten vor (Abb. 4.14 b).



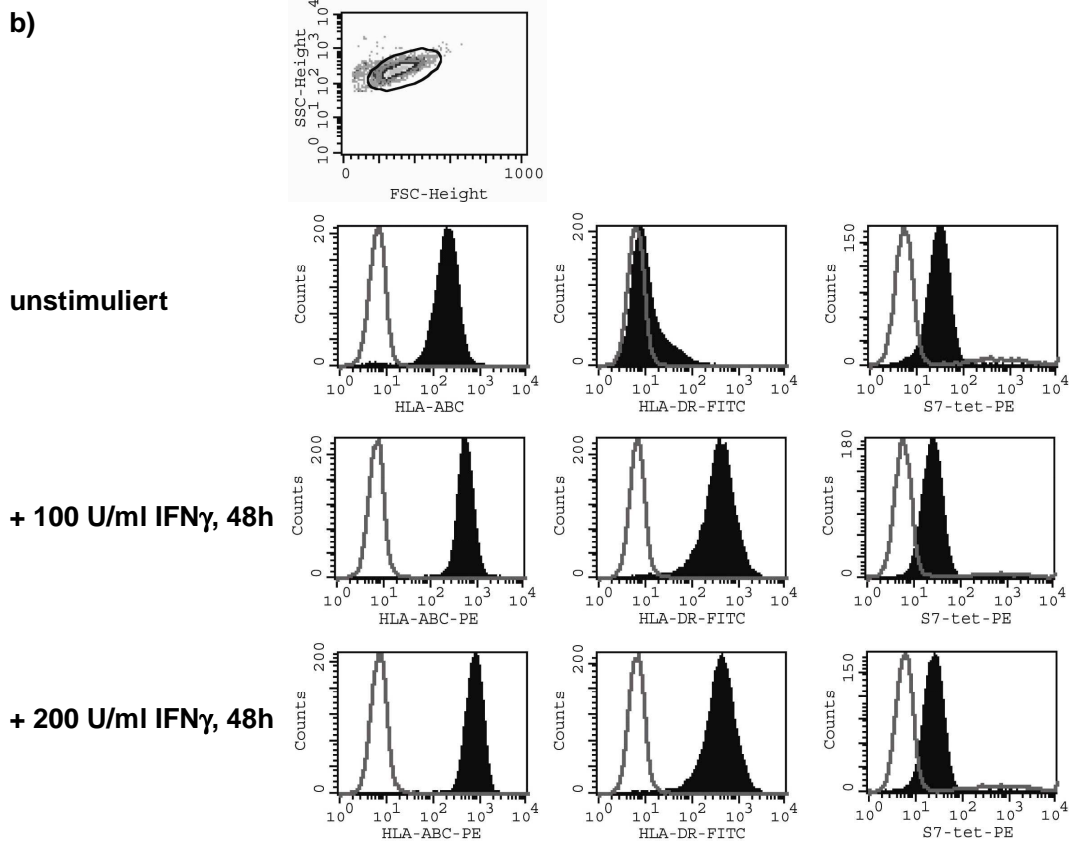


Abb. 4.14: Expression von α 2,3- und α 2,6-Sialinsäuren sowie Siglec-7, Siglec-9 und ihrer Liganden auf MSC. a) Zur Untersuchung des Sialylierungsmusters wurden die Zellen mit den pflanzlichen Lektinen SNL und MAL sowie mit Antikörpern gegen Siglec-7 und Siglec-9 und [Siglec-7]₄: SA-PE bzw. [Siglec-9]₄: SA-PE gefärbt (schwarz), SA-PE- und Isotypkontrollen sind dargestellt (grau). b) Das Expressionsmuster für Siglec-7 Liganden blieb nach Aktivierung der Zellen für 48 h mit 100 U/ml oder 200 U/ml IFN γ erhalten.

Lektine spielen nicht nur im Rahmen der Immunregulation, sondern auch bei der Zellmigration eine große Rolle. Insbesondere Selektinen kommt bei der Zell-Zelladhäsion eine bedeutende Funktion zu. Ihre Lektindomäne bindet Kohlenhydratketten Mucin-ähnlicher Zelladhäsionsmoleküle. Zell-Matrix-Adhäsionen werden hauptsächlich durch Integrine vermittelt. Es wurde daher untersucht, ob verschiedene Adhäsionsmoleküle auf MSC exprimiert werden (Tab. 4.2).

Ergebnisse

Tab. 4.2: Adhäsionsmoleküle, deren Expression auf MSC untersucht wurde.

Adhäsionsmolekül

CD18 ($\beta 2$ Integrin)

CD41 (GPIIb/IIIa, α IIb-Integrin)

CD49d (VLA-4, $\alpha 4$ -Integrin)

CD49e (VLA-5, $\alpha 5$ -Integrin)

CD49f (VLA-6, $\alpha 6$ -Integrin)

CD51 (αV -Integrin)

CD61 ($\beta 3$ Integrin, GPIIIa)

CD116 (GM-CSF Rezeptor α -Kette)

CD162 (PSGL-1, Ligand für P-Selektin)

Phänotypisierung der Zellen ergab eine Expression von CD49d, CD49e, CD51 und CD61 auf MSC. Für die Adhäsionsmoleküle CD18, CD41, CD49f, CD116 und CD162 waren die Zellen negativ.

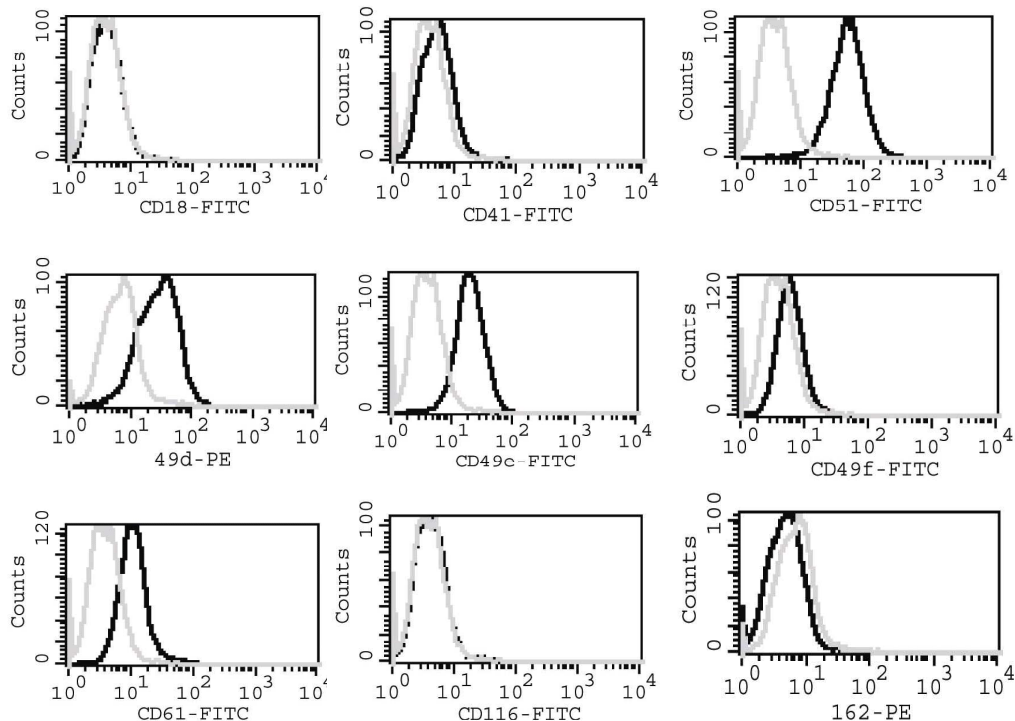


Abb. 4.15: Untersuchung von Adhäsionsmolekülen auf mesenchymalen Stromazellen. Dargestellt sind Färbungen mit Isotypkontrollen (grau) und murinen anti-humanen Antikörpern gegen die angezeigten Moleküle. Das gleiche Expressionsmuster zeigte sich bei mesenchymalen Stromazellen, die in Medium mit 5% FFPP statt 10% FCS kultiviert wurden.

4.8 Analyse des Glykosylierungsmusters maligner Zellen

Da Veränderungen im Glykosylierungsmuster häufig bei maligner Transformation auftreten, wurde insbesondere die Oberflächensialylierung von Tumorzellen näher untersucht. Eine veränderte Expression von Sialinsäurespezies könnte hierbei bewirken, dass neue Liganden für Siglecs und andere inhibitorische Lektine entstehen, die an einer Inhibition von attackierenden Effektorzellen beteiligt sind.

4.8.1 Glykosylierungsmuster Leukämischer Zelllinien

Um das Glykosylierungsmuster und insbesondere die Expression von Siglecliganden auf malignen Zellen näher zu charakterisieren, wurde das Sialylierungsmuster leukämischer Zelllinien mit Hilfe der pflanzlichen Lektine SNL, MAL sowie [Siglec-7]₄:SA-PE und [Siglec-9]₄:SA-PE detektiert. Vier leukämische Zelllinien wurden analysiert: PLB-985 (akute myeloische Leukämie), HL-60 (akute promyeloische Leukämie), KG-1a (promyeloblastische Leukämie) und K562 (chronisch myeloische Leukämie). Durchflusszytometrische Analysen ergaben Unterschiede im Glykosylierungsmuster der Zelllinien. Wie Abb. 4.16 zeigt, entsprachen Ergebnisse der Analysen mit beiden pflanzlichen Lektinen nicht dem Bindungsspektrum von [Siglec-7]₄:SA-PE und [Siglec-9]₄:SA-PE. K562 zeigten hohe Reaktivität für Siglec-7-Fusionsproteine, aber nur schwache Anfärbung mit SNL. K562 stellen ein klassisches NK-Zell-Ziel dar und können somit benutzt werden, um den Effekt von Siglec-7 Liganden auf NK-Zellvermittelte Zytotoxizität zu analysieren.

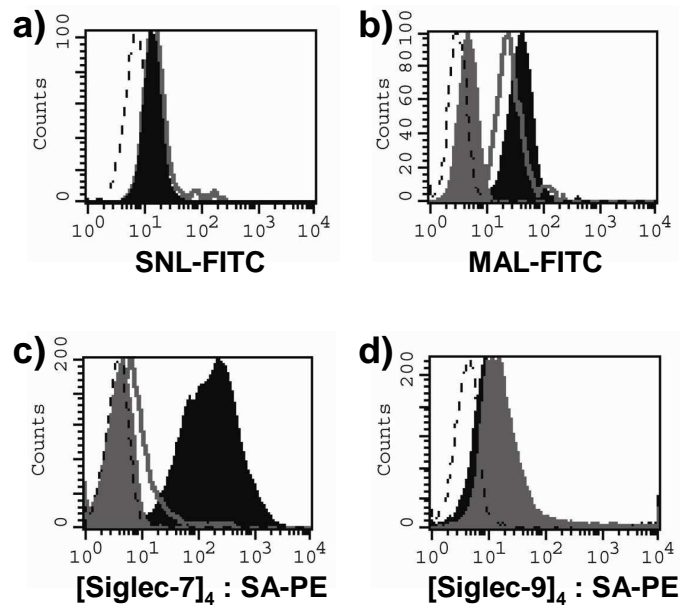


Abb. 4.16: Leukämische Zelllinien zeigen unterschiedliche Sialylierungsmuster. Die Zelloberflächensialylierung von vier leukämischen Zelllinien (PLB-985, schwarze, gestrichelte Linie; HL60, graue, gefüllte Kurve; KG-1a, graue Linie; K562, schwarze, gefüllte Kurve) wurden analysiert. Zellen wurden gefärbt a) mit FITC-konjugiertem SNL, b) biotinyliertem MAL und Streptavidin-PE oder c) [Siglec-7]₄ : SA-PE bzw. d) [Siglec-9]₄ : SA-PE.

4.8.2 Pädiatrische T-ALL-Blasten exprimieren Liganden für Siglec-7

Um zu untersuchen, inwiefern sich das Expressionsmuster von Liganden für inhibitorische Siglecs auf PBMC gesunder Spender von malignen Zellen unterscheidet, wurden neben leukämischen Zelllinien auch primäre, leukämische Zellen analysiert. Bei Kindern stellen akute lymphoblastische Leukämien die häufigste maligne Erkrankung dar. T-ALL zeigen dabei aus vielfältigen Gründen eine schlechtere Prognose als cALL (Schrauder et al., 2006).

Primäre lymphatische Blasten von pädiatrischen Patienten mit T-ALL und cALL wurden verglichen. Das Glykosylierungsmuster wies charakteristische Unterschiede zu PBMC auf. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass T-ALL Blasten Liganden für Siglec-7, aber nicht für Siglec-9 exprimieren. Auf cALL-Blasten konnten weder Liganden für Siglec-7, noch für Siglec-9 gefunden werden, obwohl ein signifikanter Teil physiologischer B-Zellen die Liganden für Siglec-7 exprimierte. Diese Ergebnisse konnten durch Phänotypisierung von je neun cALL- bzw. T-ALL

Blasten mit [Siglec-7]₄ : SA-PE und je fünf Proben mit [Siglec-9]₄ : SA-PE bestätigt werden.

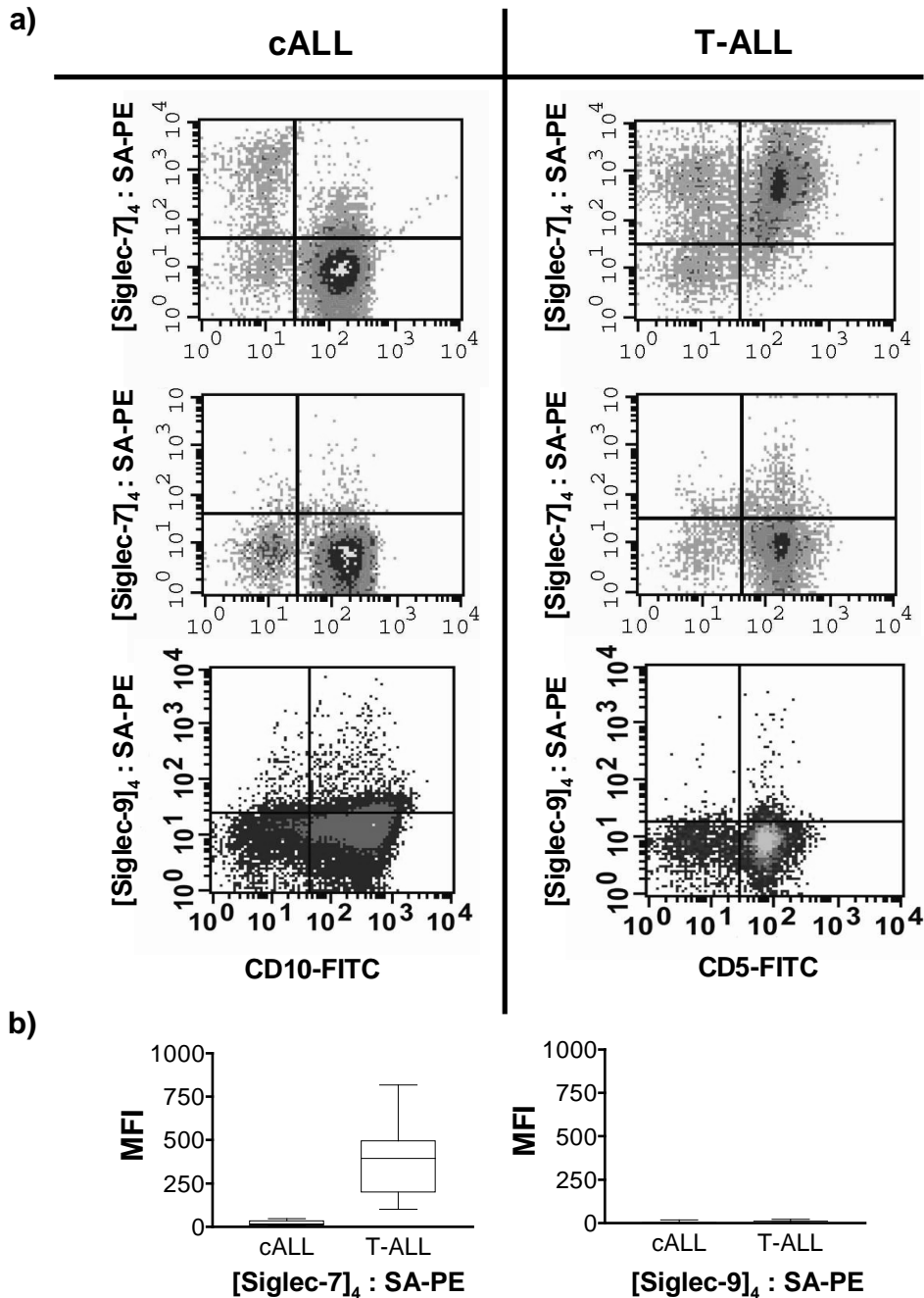


Abb. 4.17: Durchflusszytometrische Analyse primärer leukämischer Blasten von pädiatrischen Patienten mit cALL und T-ALL mit Siglec-Fusionsproteinen. a) Repräsentativer FACS Plot von PBMC pädiatrischer Patienten. Siglec-7-Liganden werden auf T-ALL Blasten aber nicht auf cALL-Blasten exprimiert (obere Reihe). Nach Behandlung mit Neuraminidase ist keine Bindung mehr detektierbar (mittlere Reihe). Liganden für Siglec-9 sind weder auf cALL noch auf T-ALL Blasten detektierbar (untere Reihe). Dieses Muster unterscheidet sich vom Expressionsmuster auf physiologischen T- und B-Zellen. b) Statistische Analyse von Phänotypisierungen mit [Siglec-7]₄ : SA-PE (n=9) und [Siglec-9]₄ : SA-PE (n=5).

4.8.3 Lösliches Siglec-7 erhöht NK-Zell-Zytotoxizität

Es ist unklar, welche Bedeutung Siglec-7 Liganden auf der Oberfläche von leukämischen Blasten zukommt. Daher wurde untersucht, ob diese phänotypischen Unterschiede mit veränderten immunologischen Eigenschaften der primären Blasten korrelieren. Da cALL-Blasten bekanntermassen besser durch NK-Zellen angegriffen werden als T-ALL-Blasten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Siglec-7-Liganden auf der Oberfläche leukämischer Blasten NK-Zellen inhibieren können. Lösliches, monomeres Siglec-7 wurde daher als kompetitiver Inhibitor in NK-Zell vermittelten Zytotoxizitätsassays eingesetzt.

Es wurde ein nicht-radioaktiver FACS-basierter Zytotoxizitätsassay etabliert. Zur Untersuchung wurde die myeloische Leukämie-Zelllinie K562 als Modellsystem gewählt. Färbungen mit [Siglec-7]₄ : SA-PE ergaben, dass sowohl K562 als auch NK-Zellen Siglec-7 Liganden exprimieren. Nach Behandlung mit Neuraminidase konnten Siglec-7-Liganden mit Hilfe von [Siglec-7]₄ : SA-PE nicht mehr detektiert werden. Siglec-7 wird auf NK-Zellen exprimiert, wie durch Analysen mit anti-Siglec-7 Antikörper gezeigt werden konnte (Abb. 4.18).

Ergebnisse

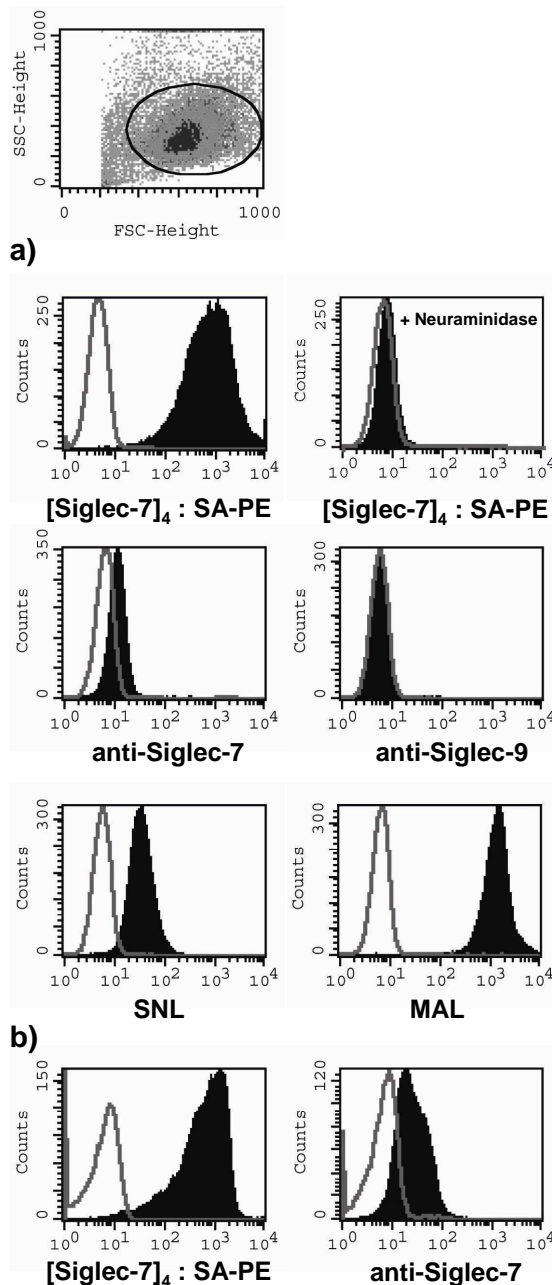


Abb. 4.18: Phänotypisierung von a) K562 und b) NK-Zellen mit [Siglec-7]₄ : SA-PE und biotinyliertem, monoklonalem Antikörper gegen Siglec-7 und SA-FITC (schwarz). K562 wurden zusätzlich mit Neuraminidase behandelt bzw. mit SNL, MAL sowie Antikörpern gegen Siglec-9 gefärbt. Als Kontrollen (grau) dienten SA-PE für Ansätze mit anti-Siglec-7 Antikörper, MAL oder [Siglec-7]₄ : SA-PE und IgG-FITC für Ansätze mit anti-Siglec-9 Antikörper oder SNL.

In diesem Assay wurden Zielzellen entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH2 oder, wenn T-ALL-Blasten als Zielzellen dienten, mit anti-CD5 FITC-konjugierten Antikörpern markiert. Nach Inkubation mit NK-Zellen als Effektorzellen wurde in der durchflusszytometrischen Analyse auf PKH2-positive Zellen gated und der Anteil an toten Zellen durch Propidiumjodid-Färbung detektiert. Der Effekt von löslichem, monomeren Siglec-7 wurde untersucht. Falls Siglec-7 Liganden eine Rolle bei der

Verteidigung maligner Zellen gegen Angriffe von Effektorzellen spielen, so sollte lösliches Siglec-7 als kompetitiver Inhibitor dienen und die spezifische Lyse steigern (Abb. 4.19).

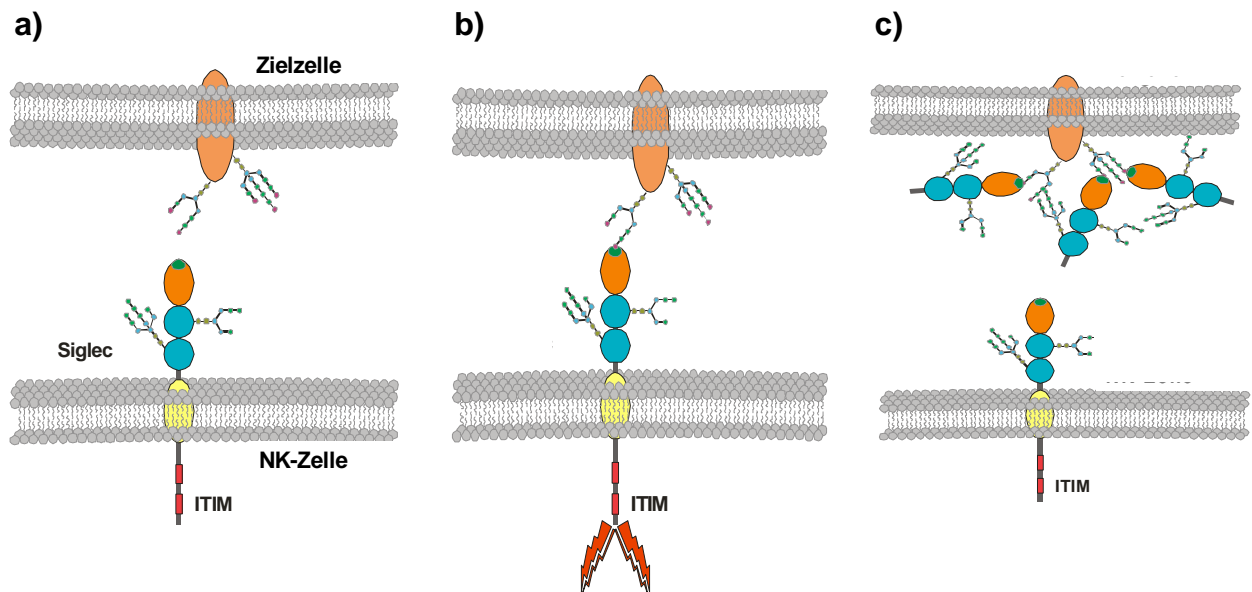


Abb. 4.19: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese. a) Der inhibitorische Rezeptor Siglec-7 wird auf NK-Zellen exprimiert. K562 oder T-ALL-Blasten als Zielzellen exprimieren Oberflächenproteine, die Sialinsäurereste als Liganden für Siglec-7 exprimieren. b) Nach Interaktion von Sialinsäureresten mit Siglec-7 auf NK-Zellen wird ein inhibitorisches Signal generiert, das die zytolytische Aktivität der NK-Zelle gegenüber der Zielzelle unterbindet. c) Vorinkubation der Zielzellen mit löslichem Siglec-7 bewirkt eine Absättigung der Ligandenbindungsstellen. Eine Interaktion von Sialinsäureresten mit Siglec-7 und eine daraus resultierende Inhibition der NK-Zellaktivität ist nicht mehr möglich. NK-Zellen können Zielzellen lysieren.

Tatsächlich wurde in Kompletionsassays die spezifische Lyse gesteigert, wenn K562 mit 1,5 µg/ml löslichem Siglec-7 vorinkubiert wurden und für 3 h zusammen mit unstimulierten oder IL-2 stimulierten NK-Zellen als Effektorzellen in Effektor:Zielzellen-Verhältnissen (E:T) von 5:1 und 10:1 kultiviert wurden (Abb. 4.20). Dieser Effekt wurde signifikant verstärkt, wenn NK-Zellen mit IL-2 stimuliert wurden. Die spezifische Lyse erhöhte sich bei E:T-Verhältnissen von 5:1 nach Zugabe von löslichem Siglec-7 von 14,7% auf 21,8% (p=0,04) und bei E:T-Verhältnissen von 10:1 von 22,7% auf 28,6% (p=0,02). Höhere E:T-Verhältnisse wurden nicht gewählt, um die Lyse in einem Bereich zu halten, der in durchflusszytometrischen Analysen detektiert werden kann. Ähnliche Ergebnisse konnten mit primären leukämischen T-ALL-Blasten als Zielzellen erhalten werden. T-ALL Blasten wurden für 4 h mit

Ergebnisse

unstimulierten oder IL-2 stimulierten NK-Zellen als Effektorzellen im E:T-Verhältnis von 20:1 kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit anti-CD5-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil an toten, Propidiumjodid-positiven Zellen wurde bestimmt. Die spezifische Lyse leukämischer Zellen wurde in Anwesenheit von löslichem Siglec-7 signifikant von 2,2% auf 11,8% ($p=0,02$) nach Kultivierung mit unstimulierten NK-Zellen und von 3,7% auf 12,3% durch Kultivierung mit IL-2 stimulierten NK-Zellen als Effektorzellen erhöht ($p=0,03$). Die spezifische Lyse war hierbei allgemein niedriger als die Lyse aus Versuchen, in denen K562 als Zielzellen eingesetzt wurden (Abb. 4.21).

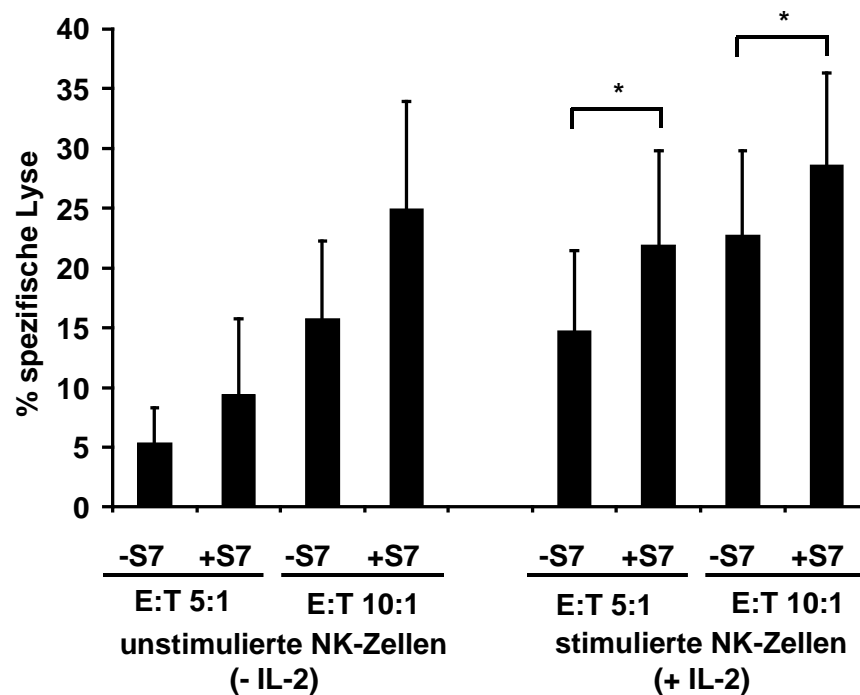


Abb. 4.20: PKH-2 Zytotoxizitätsassay von NK-Zellen gegen K562-Zellen in An- oder Abwesenheit von Siglec-7 Fusionsprotein. Lösliches Siglec-7 kompetitiert um inhibitorische Liganden und verstärkt die spezifische Lyse von K562 durch aktivierte NK-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten und die Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanzanalysen wurden mit Hilfe des T-Test für zwei gepaarte Stichproben durchgeführt, * $p<0,04$.

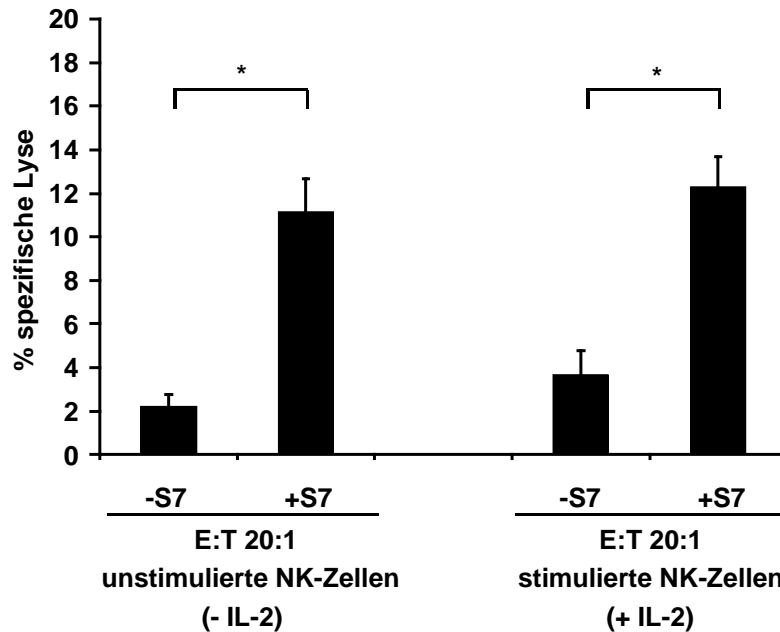


Abb. 4.21: Zytotoxizitätsassay von NK-Zellen gegen T-ALL-Blasten in An- oder Abwesenheit von Siglec-7 Fusionsprotein. Siglec-7 Liganden hemmen NK-Zell-vermittelte Lyse leukämischer Blasten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten und die Standardfehler der Mittelwerte. Signifikanzanalysen wurden mit Hilfe des T-Test für zwei gepaarte Stichproben durchgeführt, * $p < 0,04$.

Diese Ergebnisse heben die Funktion von Siglec-7 als nicht-MHC-spezifischem inhibitorischen Rezeptor auf NK-Zellen hervor und verdeutlichen, dass eine veränderte Expression von Glykanen auf malignen Zellen zu Immunescape-Mechanismen des Tumors beitragen kann.

4.8.4 Analyse des Glykosylierungsmusters mittels Glykanarray

Um weitere Aussagen über das Glykosylierungsmuster von leukämischen Blasten im Gegensatz zu nicht-malignen Zellen treffen zu können, wurde ein Screening mit Hilfe von Glykanarrays in Kooperation mit der Firma Qiagen (Hilden) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Brock (Universität Tübingen, jetzt Universität Nijmegen, NL) durchgeführt. Das Prinzip dieses Arrays beruht darauf, dass auf einen Träger gebundene Lektine unterschiedlicher Spezifität mit Glykoprotein-Proben inkubiert werden. Die Bindung der biotinylierten Glykoproteine an die jeweiligen Lektine kann nach Inkubation mit Cy[®]3-markiertem Streptavidin mit Hilfe eines Microarray Scanners detektiert werden. Zunächst wurden Glykoproteine aus der

CML Zelllinie K562 und der T-Zell-Leukämie-Zelllinie CEM isoliert und auf einem Glykanarray-Chip getestet. Ergebnisse zeigen, dass sich das Glykosylierungsmuster der beiden Zelllinien, soweit es durch die Lektine des Arrays detektiert werden kann, kaum voneinander unterscheidet. CEM-Zellen scheinen im Vergleich zu K562-Zellen eine stärkere Bindung an Lektine aufzuweisen, die N-Acetylglucosamin bzw. Fucose erkennen (Abb. 4.22). Bezüglich der Bindung an Sialinsäuren sind keine Unterschiede detektierbar. Da durchflusszytometrische Analysen mit [Siglec-7]₄:SA-PE ergeben haben, dass T-ALL-Blasten im Gegensatz zu cALL-Blasten den Liganden für Siglec-7 aufweisen, wurde im Folgenden das Glykosylierungsmuster von T-ALL- und cALL-Blasten auf einem Glykanarray näher untersucht. Als Referenz dienten T-Zellen und B-Zellen, die aus PBMC eines gesunden Spenders immunomagnetisch isoliert wurden. Hierbei wurden B-Zellen durch den Marker CD19, T-Zellen und T-ALL-Zellen durch den Marker CD3 sowie cALL-Blasten als CD10⁺-Zellen charakterisiert. Glykoproteine wurden isoliert, biotinyliert und die Bindung auf den mit Lektinen gespotteten Arrays analysiert. Auch im Vergleich von B-Zellen und cALL-Blasten lassen sich mit Hilfe des Glykanarrays keine Differenzen im Glykosylierungsmuster detektieren (Abb. 4.22). Ansätze, in denen T-Lymphozyten mit T-ALL-Blasten verglichen werden sollten, konnten auf Grund zu schwacher Signalintensitäten nicht ausgewertet werden. Weitere Test-Kits des noch nicht auf dem Markt befindlichen Glykanarrays wurden zugänglich gemacht.

Ergebnisse

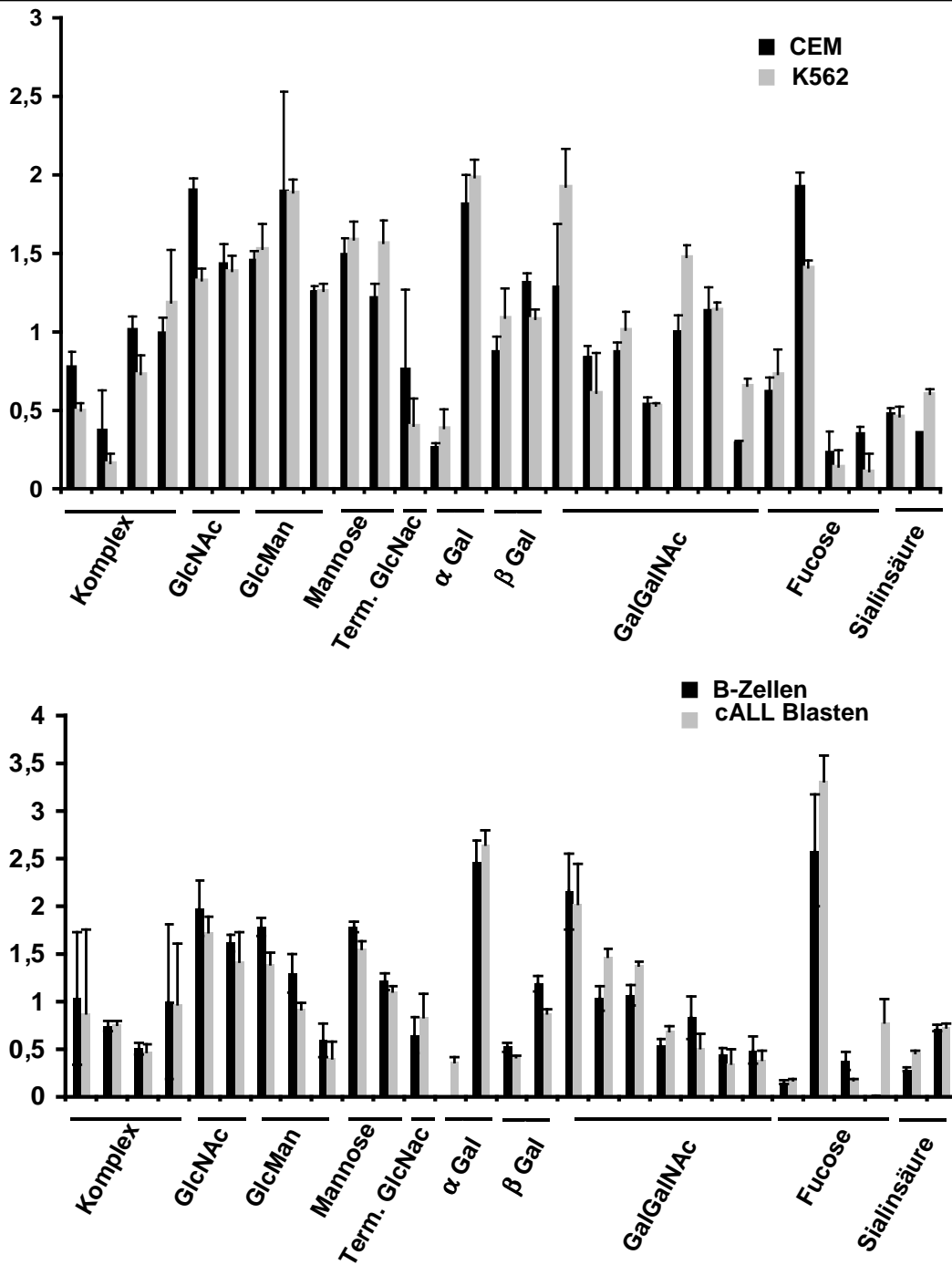


Abb. 4.22: Untersuchung des Glykosylierungsmusters mittels Glykanarray. Obere Abb.: Glykanarray von Glykoproteinen der Zelllinien K562 und CEM. Untere Abb.: Glykanarray von Glykoproteinen aus cALL-Blasten. Als Referenz dienten aus PBMC eines gesunden Spenders isolierte B-Zellen. Abk.: Komplex: N-glykosidisch verknüpfte Glykane des komplexen Typs; GlcNAc: N-Acetylglukosamin; GlcMan: Mannose haltige Glukosamine; Term. GlcNAc: terminale N Acetylglukosamine; α -Gal: α -Galaktose und α -N-Acetylgalaktosamine; β -Gal: β -Galaktose Reste; Gal/GalNAc: Galaktosereste und N-Acetyl-Galaktosamine.

4.8.5 Durchflusszytometrische Analyse solider Tumoren

Bisher wurde analysiert, welche Rolle Siglec-7 und seinen Liganden bei Immunevasionsmechanismen leukämischer Zellen zukommt. Im Folgenden soll der

Frage nachgegangen werden, inwieweit ähnliche Mechanismen auch bei anderen malignen Erkrankungen zutreffen. Hierbei wurden neben Rhabdomyosarkomlinien vor allem Neuroblastome und Mamma- und Ovarialcarcinome untersucht. Um die Frage zu klären, ob glykosylierte Antigene mögliche Angriffspunkte für eine Therapie bieten, wurde das Sialylierungsmuster von Rhabdomyosarkomlinien untersucht. In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die embryonale Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 nur geringe Dichten sowohl an $\alpha 2,3$ - als auch an $\alpha 2,6$ -Sialylierung aufweist, wohingegen die Zelllinie RD eines alveolären Rhabdomyosarkoms beide Glykanstrukturen verstärkt exprimiert. Analysen mit Siglec-7-Tetrameren hingegen ergaben keine Bindung auf RD-Zellen jedoch eine Expression der Liganden für Siglec-7 auf A204-Zellen (Abb. 4.23). Die Rezeptoren Siglec-7 und Siglec-9 werden nicht auf A204-Zellen exprimiert.

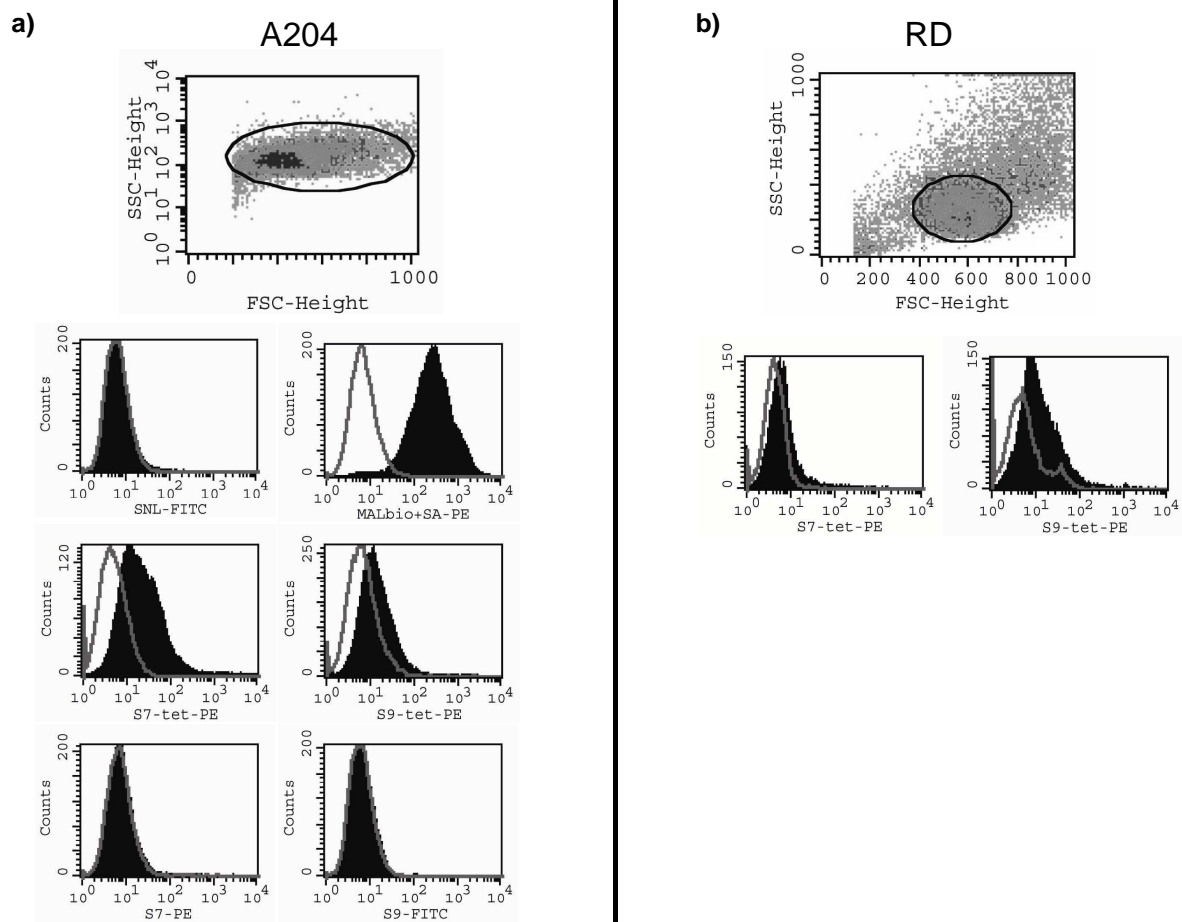


Abb. 4.23: Analyse des Glykosylierungsmusters solider Tumoren. Die Zelllinie A204 eines embryonalen und die Zelllinie RD eines alveolären Rhabdomyosarkoms wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden mit [Siglec-7]₄ : SA-PE gefärbt (schwarze, gefüllte Kurven). A204-Zellen wurden zusätzlich mit den Lektinen SNL und MAL sowie Antikörpern gegen Siglec-7 und Siglec-9 gefärbt. Isotyp- bzw. SA-PE als Kontrollen sind dargestellt (graue Linie).

4.8.6 Untersuchung von Neuroblastom-Zelllinien

Zur näheren Charakterisierung des Sialylierungsmusters und der immunologischen Eigenschaften von Neuroblastomzellen wurden in einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Eggert (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Essen) die Neuroblastom-Zelllinien SY5Y und NB69 analysiert. In cDNA-Chipanalysen dieser Neuroblastomzellen wurde gefunden, dass Rezeptoren der Tyrosinkinasefamilie Trk bei maligner Entartung verstärkt exprimiert werden. Trk A geht dabei mit einer besseren Prognose als Trk B einher. Um den Effekt dieser Rezeptoren auf eine Immunantwort zu bestimmen, wurden die verwendeten Zelllinien mit für Trk A oder Trk B kodierenden Plasmiden transfiziert. Als mock-Kontrolle diente eine Transfektion mit dem Leervektor Plncx. Zur Phänotypisierung dieser Zelllinien wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen eine unterschiedlich starke MHC I-Expression aufwiesen (Abb. 4.24). Besonders mit Trk A transfizierte Zellen zeigten eine höhere Dichte an MHC I auf der Oberfläche. Nach Stimulation mit 250 U/ml IFN γ für 24 h konnte die Expression von HLA-ABC bei allen Zellen verstärkt werden.

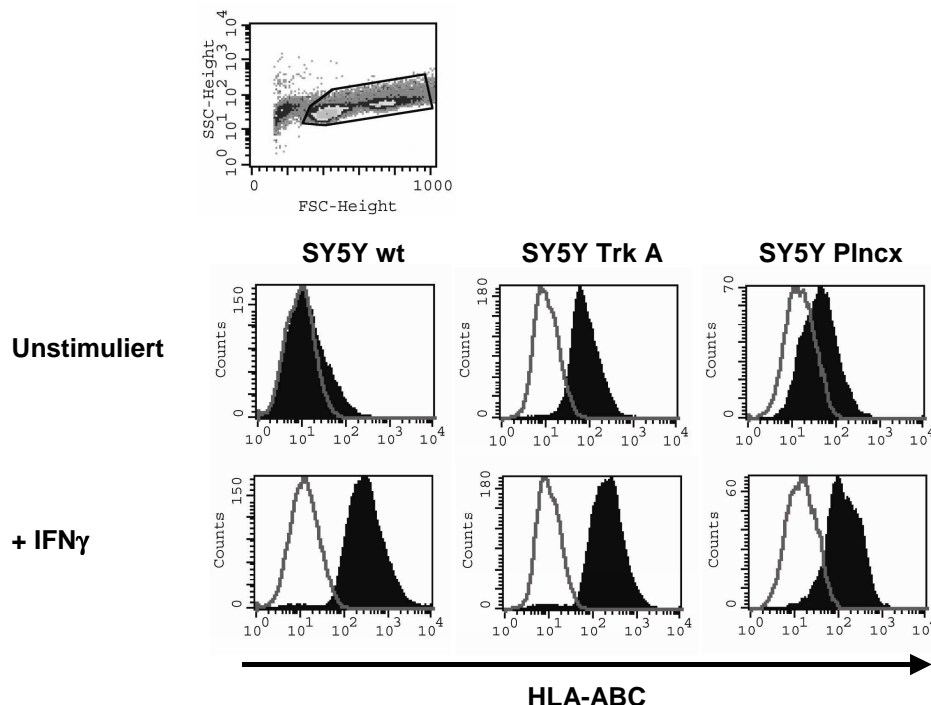


Abb. 4.24: Durchflusszytometrische Analyse der MHC I-Expression auf Zellen der Neuroblastomlinie SY5Y. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen HLA-ABC gefärbt. Wildtyp (wt)-Zellen wurden mit Zellen verglichen, die mit dem Neurotrophinrezeptor TrkA transfiziert wurden. Als Kontrolle dienen Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (Plncx). Unstimulierte Zellen (obere Reihe) wurden mit IFN γ stimulierten Zellen (250 U/ml, 24 h; untere Reihe) verglichen.

Ergebnisse

Um Aussagen über das Sialylierungsmuster der Neuroblastom-Zelllinien treffen zu können, wurden die Zellen zunächst mit Lektinen inkubiert. Durchflusszytometrische Analysen mit den pflanzlichen Lektinen SNL und MAL ergaben eine erhöhte Expression von α 2,6-Sialinsäure auf Trk A oder Trk B transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression von α 2,3-Sialinsäuren war auf Trk B transfizierten Zellen erniedrigt.

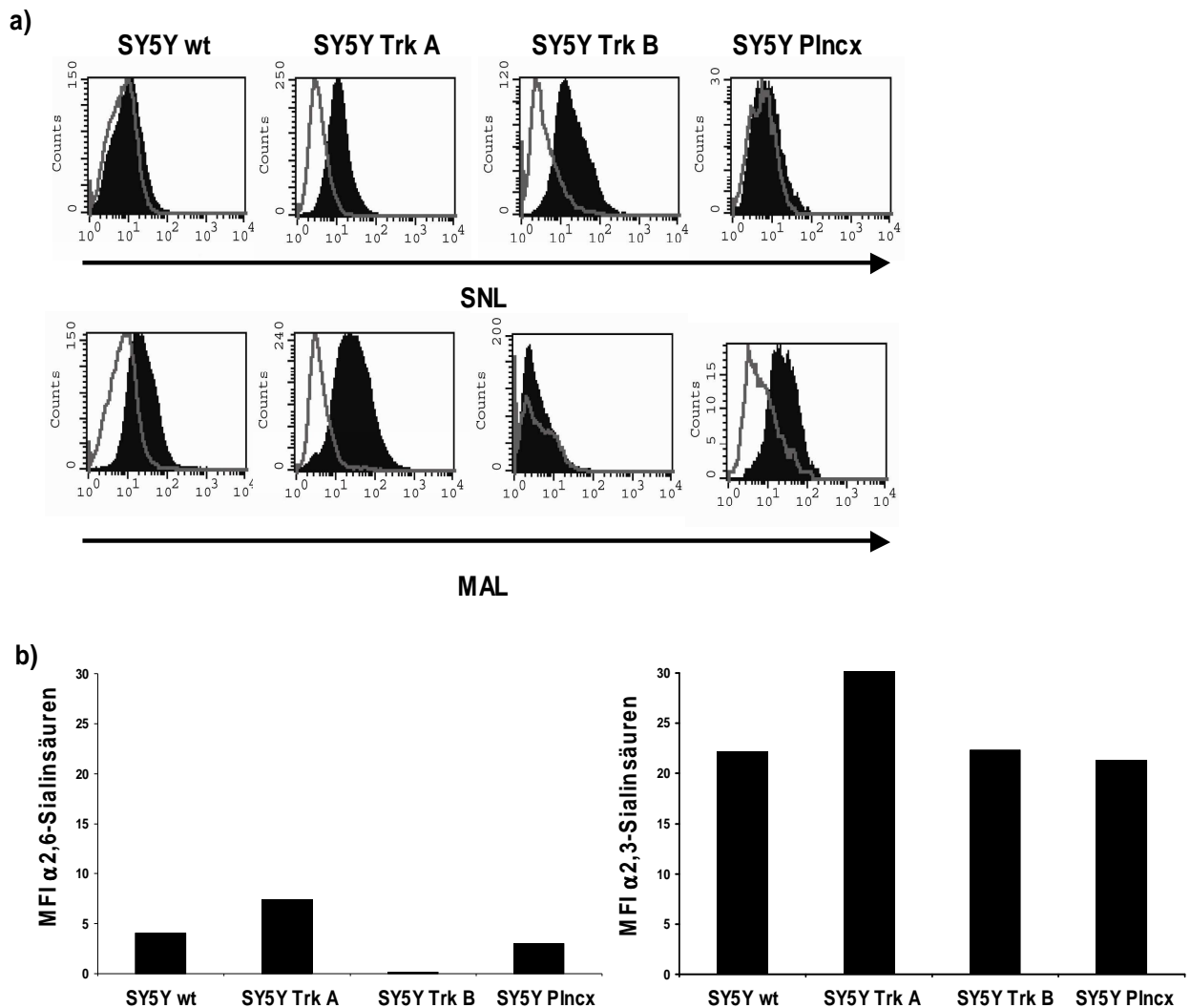


Abb. 4.25: Oberflächenfärbung von Zellen der Neuroblastomlinie SY5Y mit den pflanzlichen Lektinen SNL und MAL. Es wurde die Expression auf untransfizierten Zellen mit Zellen verglichen, die mit den Neurotrophinrezeptoren Trk A, Trk B oder mit dem Leervektor transfiziert wurden. Dargestellt sind a) die Färbungen mit Lektinen (schwarz) und die Kontrollen IgG-FITC für Färbungen mit SNL und SA-PE für Färbungen mit biotinyliertem MAL und SA-PE als Sekundärantikörper (grau) und b) die mittleren Fluoreszenzintensitäten.

Färbungen mit [Siglec-7]₄: SA-PE ergaben, dass die Zellen den Liganden für Siglec-7 nicht stark exprimieren. Nach Stimulation der Zellen mit IFN γ zeigte sich keine Veränderung.

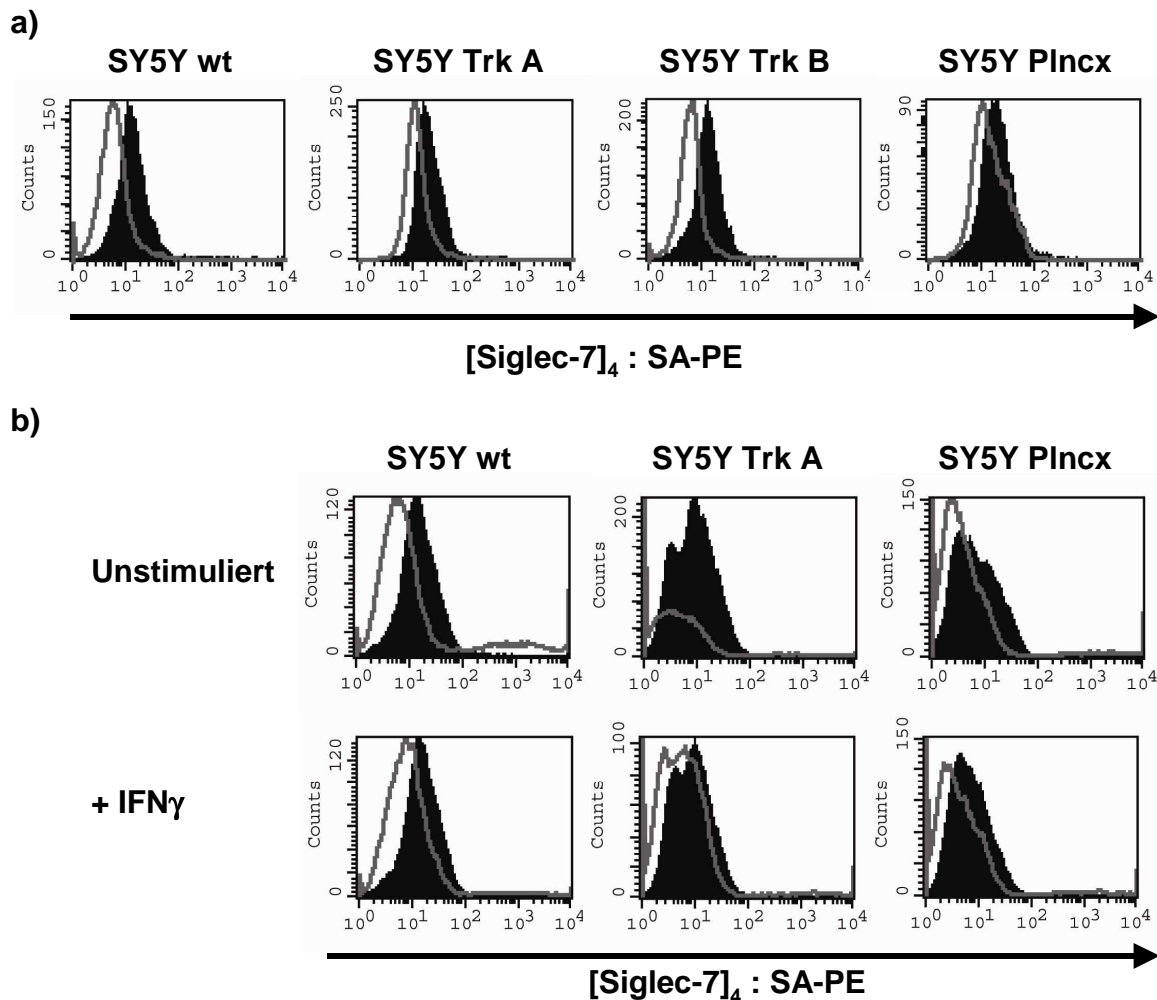


Abb. 4.26: Expression der Liganden für Siglec-7 auf Zellen der Neuroblastomlinie SY5Y. a) Zellen wurden mit [Siglec-7]₄: SA-PE gefärbt (schwarz), SA-PE diente als Negativkontrolle (grau). b) Stimulation der Zellen mit 250 U/ml IFN γ für 24 h ergibt keine Unterschiede in der Expression von Siglec-7 Liganden im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Eine Expression von Siglec-7 oder Siglec-9 konnte weder auf untransfizierten noch auf transfizierten Zellen der beiden Zelllinien detektiert werden.

Zum Vergleich wurde das Sialylierungsmuster einer weiteren Neuroblastom-Zelllinie analysiert. Färbungen der Neuroblastom-Zelllinie Sk-N-Be mit [Siglec-7]₄: SA-PE ergaben, dass diese Zellen Liganden für Siglec-7 auf der Oberfläche exprimieren. Auch das Sialinsäure-tragende Gangliosid GD₂ ist als Tumor-assoziiertes Antigen bekannt, das auf Neuroblastomen exprimiert wird. Im Rahmen der pädiatrischen

Onkologie wurde der gegen GD₂ gerichtete, chimäre Antikörper ch14.18 für immuntherapeutische Ansätze bei Patienten mit Neuroblastomen bereits eingesetzt. GD₂ unterscheidet sich vom Gangliosid GD₃, das als Ligand für Siglec-7 beschrieben wurde, nur in einer einzigen Karbohydratgruppe und könnte daher als potentieller Ligand für Siglec-7 eine Inhibition von Effektorzellen bewirken. Dieser Effekt ließe sich durch den anti-GD₂-Antikörper ch14.18 verhindern.

Färbungen der Neuroblastom-Zelllinie Sk-N-Be mit dem chimären anti-GD₂-Antikörper ch14.18 konnten zeigen, dass die Zellen das Gangliosid GD₂ exprimieren.

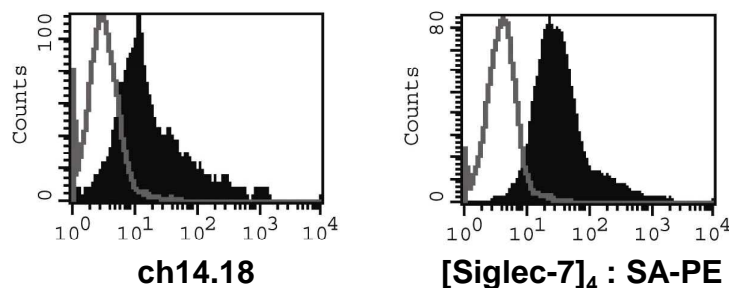


Abb. 4.27: Zellen der Neuroblastomlinie Sk-N-Be wurden mit dem chimären Antikörper ch14.18 und Maus anti-human IgG-PE bzw. mit [Siglec-7]₄ : SA-PE gefärbt (schwarze Kurven). Färbungen mit Maus anti-human IgG-PE bzw. SA-PE dienen als Negativkontrollen (graue Kurven).

Um das immunologische Verhalten von Neuroblastomen zu charakterisieren, wurden Zytotoxizitätsassays mit Zellen der Neuroblastom-Zelllinie SY5Y durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Analyse der NK-Zellantwort mit Hilfe eines FACS-basierten Zytotoxizitätsassays. Zur Untersuchung dienten untransfizierte und mit den Neurotrophinrezeptoren Trk A, Trk B sowie dem Leervektor Plncx transfizierte Zellen der Zelllinie SY5Y. Nach Anfärbung der Zellen mit PKH-2 schloss sich eine 4-stündige Inkubation an mit unstimulierten oder IL-2 stimulierten NK-Zellen als Effektorzellen in Effektor:Zielzellen-Verhältnissen (E:T) von 10:1 und 20:1 kultiviert. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde auf PKH-2 positive Zellen gated und der Anteil an toten, Propidiumjodid-positiven Zellen bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des killings der einzelnen Neuroblastomzelllinien (Abb. 4.28).

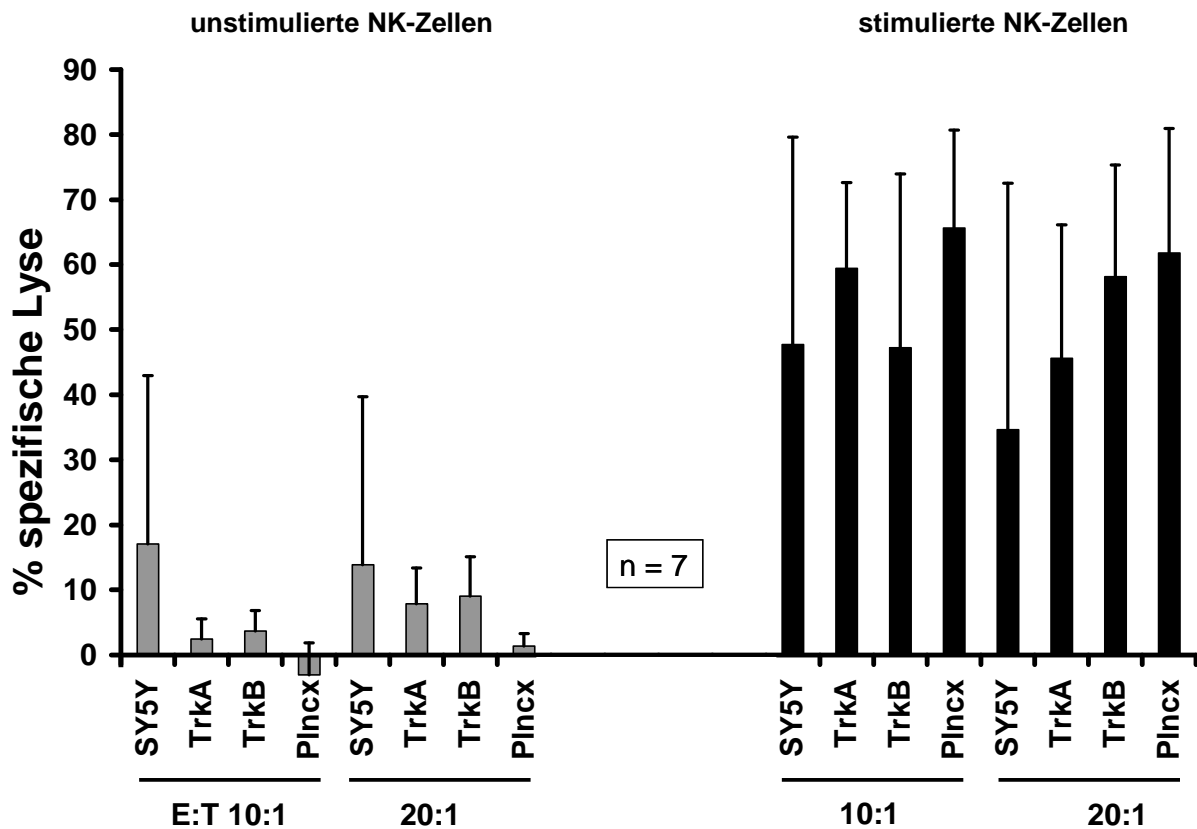


Abb. 4.28: NK-Zell vermittelte Zytotoxizitätsassays der Neuroblastomlinie SY5Y.

Da HLA-Moleküle besonders bei mit Trk A-transfizierten Zellen heraufreguliert werden, könnte man annehmen, dass einer Immunantwort durch T-Zellen, die Neuroblastom-Antigene erkennen, eine Rolle zukommt. Aus diesem Grund wurden T-Zellen generiert, die gegen Antigene der Neuroblastomlinien gerichtet waren und in Zytotoxizitätsassays gegen diese Zellen eingesetzt. Antigen-spezifische T-Zellen wurden hierbei mit Hilfe von Ag-beladenen DCs generiert. In einem ersten Ansatz wurden DCs mit Zelllysate aus Neuroblastomlinien beladen und mit CTLs cocultiviert. Proliferierende T-Zellen wurden in einem FACS-basierten Zytotoxizitätsassay getestet. Ergebnisse zeigten keine verstärkte Zytotoxizität gegenüber Neuroblastomzellen.

In einem zweiten Ansatz wurden ausgehend von einem durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Eggert in Essen durchgeführten cDNA-Array fünf Proteine ausgewählt, die in der SY5Y-Zelllinie nicht differentiell exprimiert werden. Hierbei handelt es sich um die Hitzeschockproteine HSP 90A und HSP 90B, sowie Integrin β 1 und Nukleosid Diphosphatkinase A. Über die Datenbank SYFPEITHI wurden Peptide dieser Proteine vorhergesagt und von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stevanović (Universität Tübingen) synthetisiert. Mit Hilfe dieser Peptide [SSDALDKIRY

(HSP 90A), ASDALDKIRY (HSP 90B), FTEEVEVILQY (Integrin β 1) und ASEDLLKEHY (Nukleosid Diphosphatkinase A)] wurden DCs beladen und spezifische T-Zellen generiert. Proliferierende T-Zellen wurden in einem ELISpot-Assay auf Antigen-spezifität getestet. Ergebnisse dieses Assays zeigten 121 IFN γ -produzierende Zellen/10000 CD8⁺ Zellen, die durch Kultivierung mit FTEEVEVILQY-Peptid-beladenen DCs generiert wurden und 70 IFN γ -produzierende Zellen/10000 CD8⁺ Zellen, die durch Kultivierung mit ASDALDKIRY-Peptid-beladenen DCs generiert wurden. Alle proliferierenden CD8⁺ T-Zellen, die nach durch Kultivierung mit SSDALDKIRY-, ASDALDKIRY-, FTEEVEVILQY- oder ASEDLLKEHY-Peptid-beladenen DCs generiert wurden, wurden in einem FACS-basierten Zytotoxizitätsassay getestet. Als Negativkontrolle dienten T-Zellen, die mit ungepulsten DCs kokultiviert wurden. In allen Assays konnte unabhängig von unterschiedlich eingesetzten E:T-Verhältnissen (10:1, 20:1, 50:1, 100:1) jeweils nur eine spezifische Lyse von durchschnittlich 5% detektiert werden. Auch nach Präinkubation mit 250 U IFN γ zeigte sich nur geringe Lyse. Unterschiede zwischen den als Zielzellen verwendeten SY5Y-Zelllinien ergaben sich nicht.

4.8.7 Expression von Siglecs auf PBMC und Einfluss von Zytokinen

Aus der Literatur sind vielfältige Untersuchungen zur Expression von Siglecs auf Zellen des Immunsystems bekannt. Kontrovers bleibt jedoch die Debatte, ob Siglecs auf T-Lymphozyten exprimiert werden und somit Analysen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität sinnvoll sind. Während einige Gruppen die Expression auf Subpopulationen von T-Zellen hervorheben (Ikehara et al., 2004), postulieren andere Gruppen den Verlust der Siglec-Expression auf T-Lymphozyten im Laufe der Evolution (Nguyen et al., 2006). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten mRNA-Level von Siglec-7 und Siglec-9 durch PCR in CD8⁺ T-Lymphozyten (Siglec-7 27%, Siglec-9 54%) sowie in geringerem Umfang in CD4⁺25⁻ (Siglec-7 2%, Siglec-9 9%) und CD4⁺25⁺ T-Lymphozyten (Siglec-7 3%, Siglec-9 22%) detektiert werden. Da eine Kenntnis des Expressionsmusters für immuntherapeutische Eingriffe von Interesse ist, wurde bestimmt, inwieweit sich das Expressionsmuster von Siglec-7 und Siglec-9 nach Aktivierung von PBMCs änderte. Hierzu wurden PBMC von gesunden Spendern mit 100 U/ml IL-2 und 1 μ g/ml OKT3 oder mit 250 U/ml IFN γ für 22 h oder 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Antikörpern gegen Siglec-7 oder Siglec-9 versetzt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Klone an Antikörpern

gegen Siglec-7 getestet. Die Expression von Siglec-7 auf NK-Zellen und von Siglec-9 auf NK-Zellen und Monozyten konnte bestätigt werden, T-Lymphozyten wiesen kaum Expression der beiden Rezeptoren auf (Abb. 4.29 und Abb. 4.30). Die Analysen ergaben keine Veränderungen im Expressionsmuster der jeweiligen Rezeptoren nach Stimulation der Zellen mit IL-2/OKT3, PHA oder IFN γ (ohne Abb.).

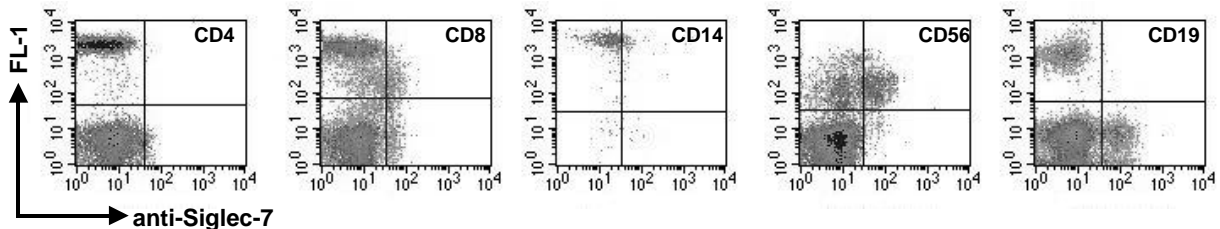


Abb. 4.29: Durchflusszytometrische Analyse der Expression des inhibitorischen Rezeptors Siglec-7 auf PBMC. PBMC gesunder Spender wurden mit monoklonalem, biotinyliertem Antikörper gegen Siglec-7 und SA-PE gefärbt. Subpopulationen wurden durch Gegenfärbung mit den angegebenen Antikörpern im FL-1 Kanal detektiert.

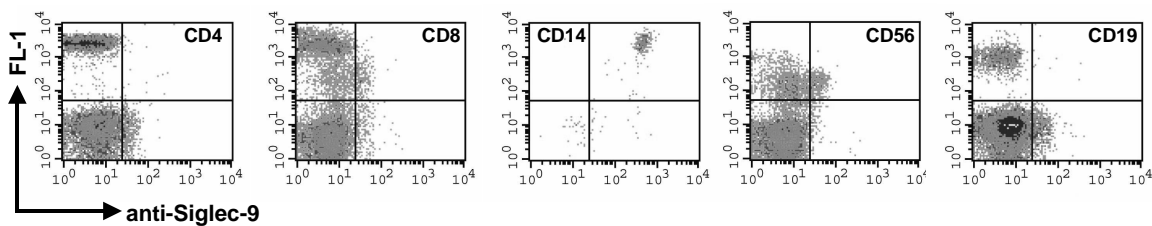


Abb. 4.30: Expression von Siglec-9 auf PBMC-Subpopulationen. PBMC gesunder Spender wurden mit monoklonalem Antikörper gegen Siglec-9 gefärbt. Subpopulationen wurden durch Gegenfärbung mit den angegebenen Antikörpern im FL-1 Kanal detektiert.

4.8.8 Glykosylierungsmuster von Mamma- und Ovarial-Carcinomen

Aus der Literatur ist bekannt, dass veränderte Glykosylierung in der Karzinogenese des Mamma-Carcinoms eine bedeutende Rolle spielt. In Vakzinierungsstudien wurden bereits glykosylierte Antigene, insbesondere das Mucin, getestet. Erfolgsversprechende Ergebnisse in in vitro- und Mausmodellen konnten jedoch in Phase II – Studien nicht reproduziert werden.

Zur Analyse des Glykosylierungsmusters wurden 4 Mamma-Carcinom- und 12 Ovarial-Carcinom-Linien, die von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen) zur Verfügung gestellt wurden, mit pflanzlichen

Ergebnisse

Lektinen gefärbt sowie auf Expression der Siglec-7 Liganden hin analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 zusammengefasst. Ein einheitliches Sialylierungsmuster der untersuchten Ovarial-Carcinom- und Mamma-Carcinom Linien konnte nicht festgestellt werden. Die meisten der untersuchten Zellen mit Ausnahme von vier Ovarial-Carcinom-Linien zeigten eine Expression von α 2,3-Sialinsäuren auf der Oberfläche. Expression von α 2,6-Sialinsäuren war hingegen nur auf 4 Ovarial-Carcinom- und 2 Mamma-Carcinom-Zelllinien zu finden. Liganden für Siglec-7 wurden auf 2 von 4 Mamma-Carcinom-Linien und auf 3 von 12 Ovarial-Carcinom-Linien exprimiert (Tab. 4.2). Eine Korrelation zwischen der Expression von α 2,6-Sialinsäuren und Expression von Siglec-7-Liganden konnte bei 2 Ovarial-Carcinomlinien festgestellt werden.

Tab. 4.3: Analyse des Glykosylierungsmusters von 4 Mamma-Carcinom- und 12 Ovarial-Carcinom-Linien. Die Zellen wurden mit [Siglec-7]₄ : SA-PE und den pflanzlichen Lektinen SNL und MAL gefärbt. + zeigt eine Detektion, - keine Detektion in durchflusszytometrischen Analysen an.

Zelllinie	Charakterisierung	[Siglec-7] ₄ : SA-PE	SNL	MAL
FraWü	Ovarial-Carcinom	++	+++	+++
Skov3	Ovarial-Carcinom	+	+	+
KS 24.22	Mamma-Carcinom	+	+	+
Ck19	Mamma-Carcinom	+	-	+++
MT	Ovarial-Carcinom	+	-	++
KS wt	Mamma-Carcinom	-	+	+
KIHe	Ovarial-Carcinom	-	++	++
SkBr3	Mamma-Carcinom	-	-	++
Elgr	Ovarial-Carcinom	-	-	++
GG	Ovarial-Carcinom	-	-	++
BG-1	Ovarial-Carcinom	-	-	+
OvCar29	Ovarial-Carcinom	-	-	+
Hey	Ovarial-Carcinom	-	-	-
Hest	Ovarial-Carcinom	-	+	-
Oaw	Ovarial-Carcinom	-	-	-
Hi	Ovarial-Carcinom	-	-	-

Zur näheren Untersuchung wurde die Mammacarcinomzelllinie KS herausgegriffen. Da HER-2/neu als Tumorantigen eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese des

Ergebnisse

Mamma-Carcinom spielt, wurden die Zellen von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen) mit HER-2/neu transfiziert. Zusätzlich wurde CD80, der Ligand für CD28 und CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen, in den Zellen überexprimiert. Die Expression von HER-2/neu und CD80 konnte in durchflusszytometrischen Analysen der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. B. Gückel bestätigt werden. Liganden für Siglec-7 wurden weder auf untransfizierten Zellen (KS wt) noch auf mit HER-2/neu (KS 4) bzw. CD80 (KS 24) transfizierten Zellen detektiert. Dagegen konnte bei Zellen, die mit HER-2/neu und CD80 transfiziert wurden (KS 24.22), eine verstärkte Bindung von [Siglec-7]₄ : SA-PE festgestellt werden.

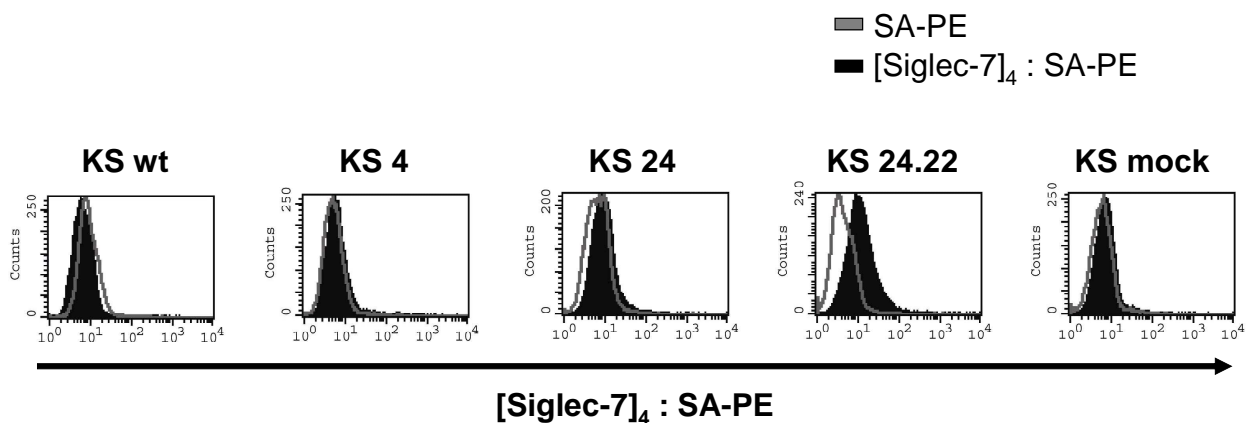


Abb. 4.31: Expression des Liganden für Siglec-7 auf Zellen der Mamma-Carcinom-Linie KS. Dargestellt sind Färbungen mit [Siglec-7]₄ : SA-PE auf untransfizierten Zellen sowie mit HER-2/neu (KS 4), CD80 (KS 24), HER-2/neu und CD80 (KS 24.22) und dem Leervektor transfizierten Zellen.

In ersten vorläufigen funktionellen Assays wurden Zytotoxizitätsassays mit der Mamma-Carcinom-Linie KS in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Gückel durchgeführt. Diese Zelllinie weist eine Expression der Liganden für Siglec-7 verstärkt nach Transfektion mit Her2/neu und CD80, die beide bei Patienten mit Mamma-Carcinom verstärkt exprimiert werden, auf. Es wurde analysiert, ob eine erhöhte Expression von Siglec-7 Liganden auf HER-2/neu und CD80 transfizierten Zellen (KS 24.22) eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber T-Zell-vermittelter Lyse bewirkt.

Zellen der Mamma-Carcinom-Linie KS 24.22 wurden in T-Zell-vermittelten Zytotoxizitätsassays, die von Ana-Cristina Bagu aus der Arbeitsgruppe von Frau

Prof. Dr. Gückel durchgeführt wurden, als Zielzellen genutzt, mit 250 U/ml IFN γ für 24 h vorinkubiert und mit spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten in verschiedenen E:T-Verhältnissen kokultiviert. Spezifische Lyse der Zellen wurde in einem Cr⁵¹-release-assay detektiert (Abb. 4.32). Nach Präinkubation der Zielzellen mit löslichem Siglec-7 zeigte sich eine Erhöhung der spezifischen Lyse. Die häufig als Zielzelle für NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität dienende Zelllinie K562 wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Weitere Untersuchungen sind geplant.

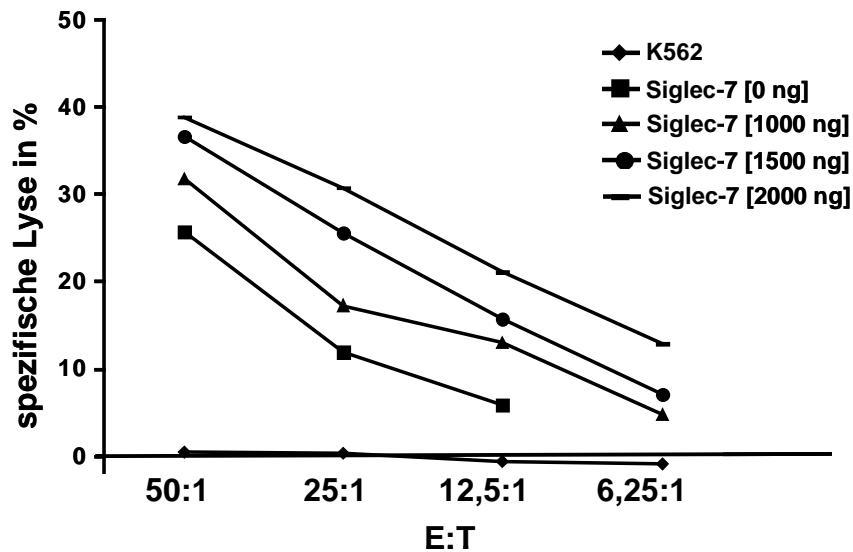


Abb. 4.32: T-Zell-vermittelter Zytotoxizitätsassay (in Kooperation mit Ana-Cristina Bagu, AG Frau PD Dr. B. Gückel, Universitäts-Frauenklinik, Tübingen).

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Sialylierung auf die Modulation von Immunantworten untersucht. Hierbei wurde insbesondere die Rolle der Sialylierung bei Prozessen der Immunevasion von Tumoren analysiert.

Untersuchungen zur Tumorimmunologie befassen sich hauptsächlich mit Zelloberflächenproteinen des Tumors oder Peptiden, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Es ist jedoch bekannt, dass Veränderungen im Glykosylierungsmuster von Zellen zu einem frühen Zeitpunkt während der malignen Transformation entstehen. Welche Rolle unterschiedlichen Glykosylierungsmustern von Zelloberflächenproteinen im Rahmen der Tumorimmunologie zukommt, ist noch nicht geklärt. Die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrierten sich auf den Prozess der Sialylierung. Es gibt Hinweise darauf, dass Mitglieder der Siglec-Familie, die über ein ITIM-Motiv verfügen, als KIR-Rezeptoren (immunoglobulin-like killing inhibitory receptors) auf Effektorzellen fungieren können (Dimasi et al., 2003). Die Haupthypothese dieser Arbeit ist, dass die Expression bestimmter Sialoglykane auf der Oberfläche maligner Zellen einen Immunevasionsmechanismus des Tumors darstellt.

5.1 Expression und Oligomerisierung rekombinanter Siglec-Fusionsproteine

Zur Untersuchung des Glykosylierungsmusters maligner Zellen wird eine verlässliche Methode benötigt. Da Glykane eine verzweigte Struktur aufweisen können, ist es schwierig, sie zu sequenzieren. Dennoch ist eine genaue Analyse von Bedeutung, da Sialylierungsprozessen eine entscheidende Rolle in der Immunregulation zukommt (Daniels et al., 2002). Die Nutzung von rekombinanten Siglec-Tetrameren eröffnet in diesem Zusammenhang neue Möglichkeiten der Untersuchung von Sialylierungsmustern, die mit Proteomics-Verfahren nicht erreicht wurden. Die Detektion von Liganden für humane Siglecs wird jedoch dadurch erschwert, dass monovalente Siglecs nur eine schwache Affinität zu Sialoglykanen aufweisen. Sialoadhesin beispielsweise weist für α -Methyl-Neuraminsäure als Liganden eine Dissoziationskonstante (K_D) von 1,7 mM, für 3'Sialyl-Lactose von 0,8 mM auf (Crocker et al., 1999). Zur Sicherung der Spezifität sind Lektine mit ihren jeweiligen

Kohlenhydrat-Bindungspartnern durch relativ schwache Wechselwirkungen miteinander verbunden. Da die Bindungskonstante einer Monosaccharid-Lektin-Interaktion meist im millimolaren Bereich liegt, weisen Lektine oft multiple Bindungsstellen auf, um die Avidität zu erhöhen (Lis und Sharon, 1998).

Die meisten Untersuchungen zu Siglecs wurden bisher mit rekombinanten, löslichen Siglec-Fc-Chimären durchgeführt, die in Bakterien exprimiert wurden. Die N-terminale Ligandenbindungsdomäne der Siglecs wurde hierbei an den Fc-Teil von humanem IgG fusioniert (Powell und Varki, 1994; Crocker et al., 1996). Fc-Chimäre können durch Bindung an Protein-A-Agarose aufgereinigt werden. Zur Identifizierung von Siglec-Liganden wurden diese Fc-Chimäre zumeist in Festphasen-Assays mittels Fc-Antikörpern auf Plastikoberflächen immobilisiert und mit den zu analysierenden Zellen inkubiert, um eine Bindung zu detektieren (Crocker et al., 1995). Da auf diesem Wege keine quantitativen Aussagen über die Menge an gebundenen Siglecs getroffen werden konnten, wurden radioaktive Assays angewandt, bei denen lösliche Komplexe aus Fc-Chimären und Fc-Antikörpern benutzt wurden (Crocker et al., 1996). Einen Nachteil dieser Methode stellt jedoch auch hier die geringe Affinität dar, mit der Sialinsäureliganden binden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, stellt der Einsatz von rekombinanten Siglec-Tetrameren eine effizientere Methode dar. Hierbei wurden die extrazellulären Domänen von Siglec-7 und Siglec-9 in Analogie zu MHC-Tetrameren oligomerisiert. Zu diesem Zweck wurden die Domänen von Siglec-7 und Siglec-9, die für die Ligandenbindung benötigt werden, in einen Vektor kloniert. Zusätzlich wurde an das 5'-Ende eine „Biotinylierungszielsequenz“ kloniert. Durch Expression der rekombinanten Siglec-Fusionsproteine in eukaryontischen Zellen konnte ihre Glykosylierung gewährleistet werden. Nach enzymatischer Biotinylierung der Fusionsproteine durch Ligase BirA konnten die Proteine durch Zugabe von Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin, welches vier Bindungsstellen für Biotin aufweist, tetramerisiert werden. Die entstandenen Siglec-Tetramere erwiesen sich als hilfreiches Instrument, um das Glykosylierungsmuster maligner Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse zu untersuchen. Im Gegensatz zu Färbungen mit monomeren Siglec-Fusionsproteinen konnten mittels dieses Verfahrens Bindungen der Tetramere an Liganden auf der Oberfläche verschiedener Zellen bei eingesetzten Konzentrationen von 1 µg/ml zuverlässig detektiert werden (Abb. 4.3).

5.2 PBMC exprimieren Liganden für Siglec-7 und Siglec-9

Durch Einsatz der Siglec-Tetramere war es möglich, im Folgenden genauere Aussagen über die Expression von Liganden auf physiologischen und malignen Zellen zu treffen. Da Siglecs auf fast allen hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, ist eine genaue Kenntnis ihrer Liganden insbesondere im Hinblick auf mögliche Therapieansätze maligner Erkrankungen von Bedeutung. Untersuchungen zu Liganden, die von Siglecs erkannt werden, wurden zumeist mit synthetischen Sialoglykanen durchgeführt (Blixt et al., 2003). Darüber hinaus wurden durch Glykanarrays Aussagen über bestimmte Motive getroffen, die von Siglecs erkannt werden (Bochner et al., 2005; Campanero-Rhodes et al., 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen von PBMC mit Siglec-Tetrameren haben gezeigt, dass Liganden für Siglec-7 sowohl auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, als auch auf CD14⁺ Monozyten und CD56⁺ NK-Zellen zu detektieren sind. CD19⁺ B-Zellen zeigten eine positive und eine negative Population nach Färbung mit Siglec-7-Tetrameren. Der Anteil der Siglec-7-Liganden exprimierenden Zellen war dabei spenderabhängig. Er lag zwischen 2% und 10%. Der Anteil an [Siglec-7]₄ : SA-PE⁺ B-Zellen bezogen auf die Anzahl an B-Zellen der einzelnen Spender lag bei 4 von 7 Spendern zwischen 30% und 40% der B-Zellen, bei 3 von 7 Spendern hingegen zwischen 65% und 75% (Abb. 4.5). Diese Verteilung lässt vermuten, dass bei einigen Spendern bestimmte Subpopulationen an B-Lymphozyten, die Liganden für Siglec-7 exprimieren, stärker vertreten sind. Durchflusszytometrische Analysen der einzelnen B-Zellsubpopulationen haben ergeben, dass aktivierte B-Lymphozyten und Gedächtnis-B-Zellen einheitlich positiv für den Siglec-7 Liganden waren. Da die Anzahl dieser Subpopulationen je nach Spender und Gesundheitszustand unterschiedlich ist, würden diese Befunde die spenderabhängige Verteilung der Siglec-7 Liganden-Expression erklären. Diese Versuche geben erste Anhaltspunkte darüber, dass die Expression von Siglec-7 Liganden die Funktion verschiedener B-Zell-Untergruppen beeinflussen könnte. Zur näheren Klärung dieser Frage sind aber phänotypische Untersuchungen an B-Zellen weiterer Spender sowie funktionelle Assays notwendig. Darüber hinaus wären Untersuchungen mit Siglec-7-Tetrameren nach vorheriger Aktivierung der B-Zellen

mit Zytokinen zu überlegen, um cis-Interaktionen, wie sie für B-Zellen beschrieben sind (Lanoue et al., 2002), zu umgehen. Andere Gruppen konnten in Immunfluoreszenzanalysen allerdings zeigen, dass Siglec-2 trotz cis-Bindung auf der eigenen Zelle auch mit Liganden auf benachbarten Zellen, insbesondere mit CD45 interagieren kann (Bakker et al., 2002; Collins et al., 2004). Welche Rolle einer Expression von Siglec-7 Liganden besonders auf aktivierten B-Lymphozyten und Gedächtnis-B-Zellen zukommt, bleibt zu überlegen. Einige Gruppen haben bereits die Bedeutung hervorgehoben, die Sialinsäureresten bei der Aktivierung von B-Zellen zukommt (Naito et al., 2007). Bei aktivierten CD8⁺ T-Zellen geht eine Aktivierung mit einer Desialylierung einher (Galvan et al., 1998; Pappu und Shrikant, 2004), beim Übergang von Effektor CD8⁺ T-Zellen zu Gedächtniszellen wurde eine veränderte Expression von O-Glykanen beschrieben (Harrington et al., 2000; Priatel et al., 2000).

5.3 Sialylierungsmuster von Zellen lymphatischer Organe

Im Rahmen von Untersuchungen dieser Arbeit liessen sich Lymphozyten, die aus Gewebe eines Lymphknotens gewonnen wurden, in eine Population unterteilen, die Liganden für Siglec-7 exprimierte und in eine, die negativ für Siglec-7-Liganden war. Eine genauere Charakterisierung dieser Populationen konnte auf Grund von fehlendem Material nicht durchgeführt werden. Für weitere Projekte ist es jedoch interessant, genauere Aussagen über das Sialylierungsmuster von Zellen in sekundären lymphatischen Organen zu treffen. Insbesondere, da reife Dendritische Zellen, die Siglec-7-Liganden exprimieren, zu den Lymphknoten wandern. Sialylierungsprozesse sind an der Entwicklung von T-Lymphozyten im Thymus beteiligt. Während der Lymphozytenreifung im Thymus unterscheiden sich reife medulläre Thymozyten von unreifen Thymozyten durch eine Sialylierung und damit eine Maskierung des Core-1 O-Glykans (Baum et al., 1996; Gillespie et al., 1993; Wu et al., 1996). Es wird vermutet, dass hierdurch reife Thymozyten an einer Interaktion mit corticalen Epithelzellen gehindert werden und zur Medulla wandern (Gillespie et al., 1993). Thymozyten wurden daher in der vorliegenden Arbeit phänotypisch untersucht. Sie zeigten eine heterogene Expression der Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 sowohl auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen untersucht werden, um weitergehende Aussagen über die Funktionen, die Sialylierungsprozesse in der T-Zellentwicklung im Thymus spielen, treffen zu können.

5.4 Sialylierung regulatorischer T-Lymphozyten

Mechanismen, über die immunregulatorische Zellen ihre toleranzinduzierende Wirkung entfalten, sind noch nicht vollständig geklärt. Da sich das Sialylierungsmuster von Zellen je nach Funktionszustand ändert (Kelm und Schauer, 1997; Metzler et al., 1994), besteht die Möglichkeit, dass die Expression von Siglec-Liganden auf immunregulatorischen Zellen zur Funktion dieser Zellen beiträgt. Störungen der Interaktion zwischen Siglecs als inhibitorischen Rezeptoren und sialylierten Liganden hätten einen Verlust der Toleranz zur Folge und könnten in Autoimmunerkrankungen resultieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Sialylierungsmuster verschiedener immunregulatorischer Zellen untersucht. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass α 2,6-Sialinsäuren von regulatorischen T-Zellen bei Aktivierung verstärkt synthetisiert werden, α 2,3-Sialinsäuren jedoch nicht (Jenner et al., 2006). Färbungen mit Siglec-Tetrameren ergaben eine Expression der Liganden für Siglec-7, nicht aber für Siglec-9 auf CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten. Da als Liganden für Siglec-7 neben α 2,8-Sialinsäuren auch α 2,6-Sialinsäuren beschrieben wurden, lässt sich diese Beobachtung mit Befunden, die nach Färbung mit pflanzlichen Lektinen erhalten wurden, in Einklang bringen. Siglec-9 bindet hauptsächlich an α 2,3-Sialinsäuren, die auf Treg nicht detektiert werden konnten. Untersuchungen bezüglich des Mechanismus, über den regulatorische T-Lymphozyten ihre Funktion vermitteln, gehen davon aus, dass Zell-Zell-Kontakt eine Rolle spielt (Jonuleit et al., 2001). Neben CD25, CTLA-4 und GITR, die für die Vermittlung des Mechanismus beschrieben wurden, wären Sialinsäure-Siglec-Interaktionen dabei möglich. Diese Ergebnisse können als Grundlage für funktionelle Untersuchungen dienen, in denen lösliches Siglec-7 beispielsweise um Liganden auf Treg kompetitiert und so die Funktion der Zellen hemmt.

5.5 Sialylierung Monozyten-abgeleiteter Dendritischer Zellen

Unreifen Dendritischen Zellen kommt eine bedeutende Rolle in der Induktion von Toleranz zu (Steinman et al., 2003). Eine Reifung Dendritischer Zellen setzt als Antwort auf Entzündungen, mikrobielle oder T-Zell-vermittelte Stimuli ein. Die Zellen

regulieren die Expression von MHC-Molekülen sowie Adhäsions- und costimulatorischen Molekülen herauf und wandern zu sekundären lymphatischen Organen, wo sie als antigenpräsentierende Zellen und Stimulatoren naiver T-Zellen wirken (Dhodapkar et al., 2001). Bezüglich der Sialylierung von DCs ist bekannt, dass MHC I Moleküle auf DCs eine Hyposialylierung aufweisen (Boog et al., 1989). C-Typ Lektin Rezeptoren wie DCIR, DCAR und Dectin-1 dienen der Internalisierung von Antigenen und der zellulären Aktivierung (Kanazawa, 2007). Dendritische Zellen können NK-Zellen aktivieren (Lucas et al., 2007; Moretta et al., 2006). Besonders reife Dendritische Zellen vermitteln die Aktivierung von ruhenden NK-Zellen (Münz et al., 2005; Ferlazzo et al., 2002). Dennoch sind diese Zellen vor NK-Zell-vermittelter Lyse geschützt. Unter diesem Gesichtspunkt ist es interessant zu klären, ob Liganden für Siglec-7 auf unreifen und reifen Dendritischen Zellen exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Dendritische Zellen aus isolierten Monozyten durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 kultiviert und durch Hinzufügen eines Reifungscocktails bestehend aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, IL-1 β , TNF α und PGE₂ gereift. Die erfolgreiche Generierung Dendritischer Zellen sowie ihre Reifung konnte durch Analyse der Oberflächenexpression der Marker CD14, HLA-DR und CD83 bestätigt werden (Abb. 4.13). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass die Dichte an α 2,6-gebundener Sialinsäure auf unreifen, tolerogenen DC im Vergleich zu reifen DC erhöht ist. cDNA Array Analysen ergaben eine Herunterregulation der mRNA der α 2,6-Sialyltransferase ST6Gal I um den Faktor 2,6 in reifen DCs (Jenner et al., 2006). α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren stellen Liganden für Siglec-7 dar.

In dieser Arbeit durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchungen des Sialylierungsmusters von DCs ergaben eine Expression von Siglec-7 und Siglec-9 auf Proteinebene auf unreifen und reifen Dendritischen Zellen. Dies bestätigte Ergebnisse aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, bei denen mRNA für Siglec-7 und Siglec-9 mittels PCR in unreifen und reifen Dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte. Unterschiede in der Expression von Siglec-7 und Siglec-9 zwischen unreifen und reifen DCs konnten nicht festgestellt werden (Abb. 4.13). Siglec-7- und Siglec-9-Liganden werden auf Monozyten exprimiert. Erfolgte eine Reifung von Monozyten-abgeleiteten Dendritischen Zellen mit LPS statt proinflammatorischen Zytokinen, so konnten Lock et al. zeigen, dass diese Zellen nach Reifung weniger Siglec-7 und Siglec-9 exprimierten als unreife DCs (Lock et al., 2004). In einer erst

kürzlich erschienenen Publikation wurde mit Hilfe von Glycanarrays, und quantitativer real time PCR gezeigt, dass während der Reifung von DCs verstärkt Fucosyl-, Galaktosyl- und Sialyltransferasen exprimiert werden. Massenspektrometrische und durchflusszytometrische Analysen mit pflanzlichen Lektinen und Siglec-Fc-Chimären ergaben eine erhöhte Expression von α 2,6-Sialinsäuren auf reifen DCs sowie eine verstärkte Bindung von Galektin-3 und -8 sowie Siglec-1, -2 und -7 (Bax et al., 2007). Auf unreifen Dendritischen Zellen waren in Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zwei Populationen von Siglec-7-Liganden positiven Zellen zu detektieren. Im Laufe der Reifung nahm diese Expression ab. Liganden für Siglec-9 zeigten sich vermehrt auf unreifen Dendritischen Zellen, auch hier nahm die Expression bei Reifung der Zellen ab. Es muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Interaktionen von Siglec-Liganden auf der Oberfläche unreifer DCs mit inhibitorischen Siglecs auf Effektorzellen des Immunsystems an der Vermittlung der tolerogenen Wirkung unreifer DCs beteiligt sind. Darüber hinaus könnten Veränderungen in der Sialylierung die Effektivität von DC-vermittelten anti-Tumorvakzinierungen steigern. Zur genaueren Untersuchung wäre es möglich, Dendritische Zellen ex vivo z. B. durch Behandlung mit Glykosidasen in ihrem Sialylierungsmuster zu verändern und mit Tumorzelllysaten zu pulsen. Die so veränderten Dendritischen Zellen könnten in Mäuse infundiert werden und entsprechende Immunantworten und Überlebensraten detektiert werden. Hierbei wäre die Untersuchung der Antigen-Aufnahme und Reifung Dendritischer Zellen, der T-Zell-Aktivierung und Zytokinproduktion sowie die Bestimmung der Anzahl an T-Zellen und aktivierter Dendritischer Zellen in den Lymphknoten von Interesse.

5.6 Sialylierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen

Multipotente mesenchymale Stromazellen stellen eine weitere Gruppe immunregulatorischer Zellen dar. Sie sind in der Lage, die Proliferation von PBMC zu verhindern (Gieseke et al., 2007). Analysen des Sialylierungsmusters von MSC ergaben, dass diese Zellen α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche tragen. α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren konnten nur schwach detektiert werden. Obwohl die Rezeptoren Siglec-7 und Siglec-9 nicht von diesen Zellen exprimiert werden, finden sich Liganden für beide Rezeptoren auf MSC. Dieses Expressionsmuster veränderte sich nicht nach Aktivierung der Zellen mit IFN γ . Der Mechanismus über den MSC

immunsuppressive Funktionen ausüben, ist bisher noch nicht vollständig geklärt (Fibbe et al., 2007; Gieseke et al., 2007). Anhand der phänotypischen Analyse des Sialylierungsmusters von MSC ist es denkbar, dass Siglecliganden oder anderen Sialoadhesinen eine Rolle bei der Vermittlung des suppressiven Effektes zukommt. Diese Hypothese ist besonders im Bereich der Tumorummunologie von Bedeutung. Die schnell proliferierende Tumoren umgebenden Stromazellen stammen hauptsächlich von MSC aus dem Knochenmark ab (Studený et al., 2004). Sialylierte Glykane auf MSC könnten über Interaktionen mit Siglecs auf Effektorzellen zu Immunescape-Mechanismen der Tumoren beitragen. Die phänotypischen Befunde dieser Arbeit könnten als Basis für Untersuchungen zur Funktion dienen.

Da Lektinen eine große Rolle bei der Zellmigration und somit auch der Tumormetastasierung zukommt, wurden in durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Adhäsionsmarker auf MSC analysiert. Es konnte eine Expression von VLA-4, α 4-Integrin (CD49d), VLA-5, α 5-Integrin (CD49e), α V-Integrin (CD51) und β 3-Integrin, GPIIIa (CD61) detektiert werden (Abb. 4.18). β 2-Integrin (CD18), GPIIb/IIIa, α IIb-Integrin (CD41), VLA-6, α 6-Integrin (CD49f), die α -Kette des GM-CSF-Rezeptors (CD116) und P-Selectin Glycoprotein Ligand PSGL-1 (CD162) wurden nicht exprimiert. Insbesondere Zell-Matrix-Adhäsionen, die durch Integrine vermittelt werden, scheinen von MSC genutzt zu werden. Die Expression der Adhäsionsmarker veränderte sich nicht, wenn die Zellen im FFPP-Wachstumsmedium kultiviert wurden. Dies ist für weitergehende Analysen der Arbeitsgruppe zu Prozessen des Homings von MSC und Analysen bezüglich der Funktion von MSC als Teil des Tumorstromas von Bedeutung.

5.7 Leukämische Zelllinien zeigen unterschiedliche Glykosylierungsmuster

Um zu untersuchen, inwieweit sich das Glykosylierungsmuster maligner Zellen vom Expressionsmuster an Siglecliganden auf physiologischen Zellen unterscheidet, wurden in der vorliegenden Arbeit leukämische Zelllinien mit Lektinen und Siglec-Tetrameren gefärbt. Hierbei zeigte sich kein einheitliches Sialylierungsmuster. Während die Zelllinie PLB-985 einer akuten myeloischen Leukämie sowohl bei Untersuchungen mit den Lektinen SNL und MAL als auch mit [Siglec-7]₄ : SA-PE und [Siglec-9]₄ : SA-PE eine niedrige Sialylierung aufwies, zeigten die weiteren drei

untersuchten Zelllinien eine ähnliche Expression von α 2,6-Sialinsäuren, aber unterschiedliche starke Expression von α 2,3-Sialinsäuren und Liganden für Siglec-7 und Siglec-9. Ein übereinstimmendes Sialylierungsmuster zwischen Analysen mit Siglectetrameren und pflanzlichen Lektinen ist nicht zu erwarten. Siglec-7 erkennt beispielsweise neben α 2,6-Sialinsäuren, die durch das Sambucus nigra Lektin detektiert werden, auch α 2,8-verknüpfte Sialinsäuren (Alphey et al., 2003). Färbungen mit Lektinen scheinen geeignet zu sein, um erste Aussagen über das Sialylierungsmuster zu treffen. Für weitere Analysen, die das Sialylierungsmuster im humanen Immunsystem wiedergeben, erweisen sich Färbungen mit rekombinanten Siglec-Fusionsproteinen jedoch als angebracht. Darüber hinaus ist es schwierig, Lektine in funktionellen Assays einzusetzen, da sie auf Grund mehrerer Bindungsstellen quervernetzend und dadurch bereits aktivierend wirken können. Neue Erkenntnisse bezüglich des Sialylierungsmusters leukämischer Zellen gewinnen an Bedeutung, da in der Literatur beschrieben wird, dass eine Quervernetzung von Siglec-7 oder Siglec-3 bei chronisch-myeloischer Leukämie zu einer Inhibition der Zellproliferation führt (Vitale et al., 2001). CD33 scheint dabei im Gegensatz zu Siglec-7 über die Induktion von Apoptose zu wirken (Mingari et al., 2001). Siglec-7 und CD33 könnten daher als Zielmoleküle für CML-Therapien genutzt werden (Vitale et al., 1999).

5.8 Untersuchung des Glykosylierungsmusters mittels Glykanarray

Um erste Aussagen über das Glykosylierungsmuster primärer leukämischer Zellen treffen zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit cALL-Blasten und T-ALL-Blasten auf einem Glykanarray untersucht. Glykanarrayanalysen wurden mit Hilfe des Qproteome Glycoprofiling Kits der Firma Qiagen durchgeführt, das sich noch in der Entwicklungsphase befindet und unserer Arbeitsgruppe in Form eines Field-Test Kits zur Verfügung gestellt wurde. T-Zellen, B-Zellen sowie T-ALL-Blasten und cALL-Blasten wurden durch immunomagnetische Sortierung aufgereinigt. Die membranständigen Glykoproteine wurden isoliert, durch Zugabe von nicht-permeablem Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert und auf die Membran der Array-Objektträger gegeben, die mit Lektinen unterschiedlicher Selektivität in verschiedenen Konzentrationen bestückt war. Durch Zugabe von Fluorochrom-markiertem Streptavidin konnte mit Hilfe eines Scanners eine Bindung der auf dem

Array gebundenen Lektine an biotinylierte Glykoproteine der Proben nachgewiesen werden. Analysen der Arrays konnten nur mit cALL-Blasten im Vergleich zu B-Zellen durchgeführt werden, nicht jedoch mit T-ALL-Blasten im Vergleich zu T-Zellen, da die T-ALL-Proben zu geringe Signalintensitäten aufwiesen. Die Ergebnisse des Glykanarrays zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Bindung von Glykoproteinen aus cALL-Blasten im Vergleich zu Glykoproteinen aus B-Zellen an auf den Array gebundene Lektine. Unterschiedliche Glykosylierungsmuster von cALL-Blasten im Vergleich zu B-Zellen konnten somit durch die Lektine des Glykanarrays nicht detektiert werden. Aussagen über die Oberflächensialylierung entsprachen nicht den Ergebnissen, die nach Färbung mit Siglec-Tetrameren getroffen werden konnten. Diese Technik ist daher als Screening-Verfahren zur genaueren Analyse des Glykosylierungsmusters nicht geeignet. Färbungen mit humanen Proteinen liefern in diesem Fall verlässlichere Ergebnisse als Färbungen mit pflanzlichen Lektinen, die das Glykosylierungsmuster nur in erster Näherung wiedergeben. Generell ist die Technik der Glykanarrays aber geeignet, nähere Bestimmungen von Strukturen, die als Siglec-Liganden dienen, durchzuführen. In Analysen verschiedener Arbeitsgruppen wurden dabei nicht pflanzliche Lektine, sondern synthetisierte Glykanstrukturen, die auf die Arrays gebunden werden, benutzt. So konnten Bochner et al. Liganden für Siglec-8 dadurch identifizieren, dass sie die Bindung chimärer Siglec-8-Ig Proteine an 172 biotinylierte Glykanstrukturen testeten, die auf Streptavidin-gebundenen Platten immobilisiert wurden (Bochner et al., 2005). Campanero-Rhodes et al. haben mittels Glykanarrays den Einfluss von Sulfatierung auf die Bindung von Siglecs untersucht (Campanero-Rhodes et al., 2006). Dadurch wird es möglich, Aussagen über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Oligosacchariden zu treffen, die als Liganden für Rezeptoren des Immunsystems wie Siglecs dienen. Unterschiede könnten bedeutende funktionelle Auswirkungen beispielsweise auf die Migration oder Signaltransduktion von Leukozyten haben.

5.9 Pädiatrische T-ALL-Blasten exprimieren Liganden für Siglec-7

Untersuchungen der vorliegenden Arbeit von primären leukämischen Blasten pädiatrischer Patienten ergaben, dass T-ALL-Blasten im Gegensatz zu cALL-Blasten den Liganden für Siglec-7 stark exprimieren. Der Ligand für Siglec-9 wurde nicht

exprimiert. Dieser Effekt war Sialisäure-abhängig, wie durch Behandlung der Blasten mit Neuraminidase gezeigt werden konnte

Abb. 4.17). In Studien konnte eine schlechtere Prognose für Kinder mit T-ALL im Gegensatz zu Kindern, die an cALL erkrankt sind, festgestellt werden (Schrauder et al., 2006). Es wurde bereits beschrieben, dass eine veränderte Sialylierung mit verstärkter Proliferation von Lymphoblasten bei ALL korreliert (Ghosh et al., 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Siglec-2, -3, -5 und -6 an Tumorspezifische Antigene wie Sialyl-Tn binden (Brinkman-Van der Linden EC und Varki,2000). Es wurde daher in der hier vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Liganden für Siglec-7 auf T-ALL Blasten NK Zellen inhibieren und so an Immunescape-Mechanismen dieser Blasten beteiligt sind.

5.10 Lösliches Siglec-7 erhöht die NK-Zell-Zytotoxizität

Sialinsäurereste wurden bereits als inhibitorische Liganden für NK-Zellen, insbesondere nach Reduktion der cis-Interaktionen von Siglec-7 und Sialinsäuren identifiziert (Avril et al., 2006a). Um den Einfluß von löslichem Siglec-7 auf die Lyse maligner Zellen durch NK-Zellen oder zytotoxische T-Zellen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein nicht-radioaktiver, FACS-basierter Zytotoxizitätsassay in Anlehnung an publizierte Methoden (Fischer et al., 2002; Hatam et al., 1994; Lee-MacAry et al., 2001; Zimmermann et al., 2005) etabliert. Hierbei wurden Zellen der CML-Linie K562 als Zielzellen benutzt und mit dem Farbstoff PKH2 markiert. PKH wird auf Grund seiner lipophilen, aliphatischen Reste in die Plasmamembran aufgenommen, ohne dabei die Zellen zu zerstören. So wird eine Unterscheidung zwischen Ziel- und Effektorzellen ermöglicht. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde auf PKH-positive Zellen gated und der Anteil lysierter Zellen durch Färbung mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid bestimmt. Propidiumjodid färbt dabei nur Zellen an, deren Membran permeabilisiert ist. Wurden PBMC als Zielzellen benutzt, so wurde auf eine Anfärbung mit PKH verzichtet. Stattdessen wurden die Zellen nach Koinkubation mit Effektorzellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und der Anteil lysierter Zellen durch Färbung mit Propidiumjodid bestimmt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Zytotoxizitätsanalysen auf Einzelzellbasis durchgeführt werden können. Im Gegensatz zu Messungen, die die Lyse der

Zielzellen über Freisetzung von ^{51}Cr oder Europium bestimmen, kann in der durchflusszytometrischen Analyse jede Zelle in ihrer Morphologie betrachtet werden. Dieses Verfahren erfordert zwar eine zeitaufwändigere Analyse, liefert aber genauere Ergebnisse. Darüber hinaus wird eine radioaktive Markierung vermieden. Es konnte gezeigt werden, dass Ergebnisse dieser Methode mit Ergebnissen aus ^{51}Cr release assays korrelierten (Fischer et al., 2002).

Ein weiterer Vorteil der FACS-basierten Methode im Gegensatz zu anderen Zytotoxizitätsassays besteht darin, dass nicht-homogene Zielzellpopulationen unterschieden werden können. Diese Methode gewinnt vor allem in der Untersuchung von leukämischen Blasten an Bedeutung, da sich oftmals in Patientenproben leukämischer Blasten ein hoher Anteil normaler PBMC findet. Durch Anfärbung der Blastenpopulation mit spezifischen Antikörpern wird eine Untersuchung allein dieser Zellen möglich. Schwierigkeiten dieser Methode liegen neben der zeitintensiven und präzisen Probenvorbereitung im Einstellen der durchflusszytometrischen Parameter, insbesondere im Festlegen der Gates. Da tote Zellen sich im Vergleich zu lebenden Zellen in ihrer Morphologie unterscheiden, muss eine Veränderung im forward und side scatter beachtet werden.

Als Modellsystem zur Untersuchung der Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit K562 benutzt, die den Liganden für Siglec-7 exprimieren (Abb. 4.18). Hierbei handelt es sich um ein klassisches NK-Zell-Target. In Kompetitionsassays wurde die spezifische Lyse nach Vorinkubation mit löslichem Siglec-7 gesteigert (Abb. 4.20). Ähnliche Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn primäre leukämische T-ALL-Blasten als Zielzellen dienten (Abb. 4.21). Diese Ergebnisse zeigen, dass inhibitorische Siglecs auf der Oberfläche von Effektorzellen zu Immunevasionsmechanismen maligner Zellen beitragen können. Hierzu finden sich auch Hinweise in der Literatur. Siglec-7 wird eine Rolle als KIR zugeschrieben (Nicoll et al., 2003). Diese Studie wurde allerdings mit murinen Zellen durchgeführt. Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verdeutlichen den Effekt der NK-Zell-Inhibition durch Siglec-7 im humanen System. Auch für Mucine, die das auf Carcinomen verstärkt exprimierte sialylierte Tn-Antigen tragen, wurde eine Hemmung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegen K562 beschrieben (Ogata et al., 1992). Eine andere Gruppe hingegen konnte keinen Einfluss von $\alpha 2,6$ -Sialinsäuren, die verstärkt bei Colonicarcinomen exprimiert werden und mit verstärkter Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert werden, auf NK-Zell-

vermittelte Lyse detektieren (Dall'Olio et al., 1997). Auch Neuraminidase-Behandlung hatte in diesen Untersuchungen keinen Effekt. Da Siglec-7 neben α 2,6-Sialinsäuren jedoch hauptsächlich α 2,8-gebundene Sialinsäuren erkennt, könnten diese Ergebnisse mit denen der vorliegenden Dissertation in Einklang stehen. Sowohl bei Zytotoxizitätsassays mit K562 als auch mit T-ALL-Blasten als Zielzellen findet sich eine Lyse maligner Zellen ohne dass eine Reduktion der cis-Interaktionen von Siglec-7 und Sialinsäuren z. B. durch Sialidase-Behandlung der NK-Zellen, wie sie beschrieben wurde (Avril et al., 2006a), durchgeführt worden ist. Nach Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 lässt sich aber eine stärkere Lyse im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen detektieren. Aktivierung von Zellen geht oftmals mit einer Hyposialylierung durch membranständige Neuraminidasen einher (Galvan et al., 1998; Kaech et al., 2002; Pappu und Shrikant, 2004); die Expression von Liganden auf derselben Zelle wird verringert und eine Maskierung aufgehoben, so dass Siglecs mit Liganden auf der Oberfläche benachbarter Zellen trans-Interaktionen eingehen können (Freeman et al., 1995). Eine Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 könnte daher eine Reduktion der cis-Interaktionen von Siglec-7 und Sialinsäuren bewirken. Es wurde aber auch beschrieben, dass cis-Interaktionen die Bindung von Liganden in trans zwar verringern, nicht jedoch völlig unterbinden können (Collins et al., 2006). Trotz bestehender cis-Interaktionen können trans-Interaktionen insbesondere mit hochaffinen Liganden, wie sie bei Zell-Zell-Interaktionen oder Zell-Pathogen-Interaktionen vorkommen, stattfinden. Dies erklärt die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit detektierte Lyse durch NK-Zellen, die nicht mit IL-2 stimuliert wurden.

Um den Beitrag von Siglec-7 an NK-Zell-vermittelter Lyse zusätzlich zu weiteren KIR-Rezeptoren zu quantifizieren, wären Blockierungsexperimente mit anti-MHC II-Antikörpern auf T-ALL-Blasten zu überlegen.

5.11 Sialylierung solider Tumoren

Rhabdomyosarkome stellen eine schwierig zu therapierende maligne Erkrankung dar. Infiltrierende T-Zellen werden in Tumoren gefunden. Diese attackieren aber den Tumor nicht und zeigen oft eine gestörte antigen-spezifische, zytolytische Aktivität (Brossart et al., 2001; da-Nagai et al., 2000; Gajewski, 2006; Guilloux et al., 1994; Mulder et al., 1996). Mögliche Ursachen hierfür werden in vielfältigen Immunescape-

Mechanismen des Tumors gesehen, zu denen auch Veränderungen im Glykosylierungsmuster der malignen Zellen gerechnet werden können.

Das Sialylierungsmuster einer embryonalen und einer alveolären Rhabdomyosarkomlinie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, um Anhaltspunkte darüber zu finden, ob glykosylierte Antigene mögliche Angriffspunkte für eine Therapie dieser Erkrankung bieten. Vorausgegangene Analysen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die alveoläre Rhabdomyosarkomlinie RD α 2,3- und α 2,6-Sialinsäuren exprimiert, wohingegen die embryonale Rhabdomyosarkomlinie A204 kaum α 2,3- und α 2,6-Sialylierung aufweist. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte nach Inkubation mit TNF α und IFN γ auf A204-Zellen eine leichte Heraufregulierung von α 2,6-gebundener Sialinsäure beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Sialylierungsmuster beider Zelllinien mit Hilfe von Siglecfusionsproteinen untersucht. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen korrelierten nicht mit den Befunden, die in Untersuchungen des Sialylierungsstatus mit pflanzlichen Lektinen gewonnen wurden. Siglec-7 Liganden konnten nicht auf Zellen der alveolären Rhabdomyosarkomlinie RD sondern nur auf Zellen der embryonalen Rhabdomyosarkomlinie A204 detektiert werden (Abb. 4.23). Liganden für Siglec-9 fanden sich auf beiden Zelllinien nur in geringem Maße. Da für Siglec-7 hauptsächlich α 2,8-gebundene Sialinsäuren als Liganden beschrieben wurden, deren Expression in der vorliegenden Arbeit nicht mit pflanzlichen Lektinen untersucht wurde, ist nicht zu erwarten, dass die Sialylierungsmuster, die von Lektinen und Siglecfusionsproteinen detektiert werden, übereinstimmen. Eine Expression der inhibitorischen Rezeptoren Siglec-7 und Siglec-9 konnte in Analysen der vorliegenden Arbeit auf beiden Zelllinien nicht detektiert werden. Um nähere Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit eine veränderte Sialylierung auch bei soliden Tumoren an Prozessen des Immunescape durch Interaktion mit inhibitorisch wirkenden Siglecs auf Effektorzellen beteiligt ist, sind aufbauend auf die phänotypischen Ergebnisse mit Zelllinien Untersuchungen mit Zellen aus primären Tumorgewebe geplant, an die sich funktionelle Untersuchungen anschließen müssten. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Siglec-2, -3, -5 und -6 an Tumor-spezifische Antigene wie Sialyl-Tn binden (Brinkman-Van der Linden EC und Varki,2000). Auch andere Autoren beschreiben eine Interaktion von inhibitorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von CTLs und NK-Zellen mit

veränderten Glykoproteinen (Ikehara et al., 2004; Ravetch und Lanier, 2000; Varki und Angata, 2006). So wäre es denkbar, Immunantworten gegen Rhabdomyosarkome in Zytotoxizitätsassays zu untersuchen und Veränderungen durch Blockade der Interaktion von Siglecs und ihren Liganden zu detektieren. Darüber hinaus würde eine Behandlung der Zellen mit Neuraminidase oder eine Transfektion mit siRNA gegen ausgewählte Sialyltransferasen interessante Möglichkeiten bieten, die Rolle der Sialylierung bei Immunevasionsmechanismen dieser Tumoren näher zu beleuchten.

5.12 Sialylierung von Neuroblastomlinien

In dieser Arbeit durchgeführte Analysen des Sialylierungsmusters der Neuroblastomlinie SY5Y ergaben eine Expression von α 2,3-Sialinsäuren nicht jedoch von α 2,6-Sialinsäuren. Wurden die Zellen mit den Neurotrophinrezeptoren Trk A oder Trk B transfiziert, so konnte eine erniedrigte Expression von α 2,3-Sialinsäuren auf Trk B transfizierten Zellen und eine erhöhte Expression von α 2,6-Sialinsäuren auf Trk A und Trk B transfizierten Zellen im Vergleich zu Transfektionen mit dem Leervektor als Kontrolle detektiert werden. Liganden für Siglec-7 konnten - auch nach Stimulation mit IFN γ - nur schwach detektiert werden (Abb. 4.26). Bezüglich NK-Zell-vermittelter Lyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen. In T-Zell-vermittelten Zytotoxizitätsassays konnten Zellen kaum lysiert werden. Dies könnte an der niedrigen HLA-Expression der SY5Y wt-Zelllinien liegen. Zytotoxizitätsassays mit löslichem Siglec-7 als Kompetitor wurden nicht durchgeführt. Hier bietet es sich an, diese Versuche mit anderen Neuroblastomlinien wie z. B. Sk-N-Be durchzuführen, die die Liganden für Siglec-7 verstärkt exprimieren (Abb. 4.27). Bezüglich der unterschiedlichen Glykosylierung zwischen T-Zell-Leukämieblasten und B-Zell-Leukämieblasten ist bekannt, dass T-Zell-Leukämieblasten eine hohe Expression der Ganglioside GD₂ und GD₃ aufweisen, B-Zell-Leukämieblasten jedoch nicht (O'Boyle et al., 1996; Okada et al., 1996). Das verzweigte Gangliosid GD₂ wird ebenfalls auf der Neuroblastomlinie Sk-N-Be exprimiert, wie durch Analysen mit dem Antikörper ch14.18 gezeigt werden konnte (Abb. 4.27). GD₂ unterscheidet sich in seiner Struktur nur durch einen zusätzlichen N-Acetylgalaktosaminrest vom Gangliosid GD₃, das als Ligand für Siglec-7 beschrieben wurde (Nicoll et al., 2003; Rapoport et al., 2003). Interessanterweise

wird die entsprechende Sialyltransferase ST8Sial-I in manchen Neuroblastomzellen hoch exprimiert. Die Expression korreliert mit einem schlechteren Krankheitsverlauf (Cheung et al., 2006). Im Rahmen der pädiatrischen Onkologie wurde dieses Gangliosid experimentell untersucht. GD₂ wurde dabei als Ziel für Antikörper-vermittelte, immuntherapeutische Ansätze bei Patienten mit Neuroblastomen eingesetzt (Otto et al., 2005; Simon et al., 2004). Der chimäre anti-GD₂ Antikörper ch14.18 bindet humane Neuroblastomzellen und erwies sich als effektiv in der Lyse von Neuroblastomzellen durch Granulozyten (Barker et al., 1991). Experimentelle Daten haben gezeigt, dass der chimäre Antikörper ch14.18 seine Wirkung hauptsächlich durch Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) von NK-Zellen gegen maligne Zellen vermittelt (Otto et al., 2005). Das Disialogangliosid GD₂ würde als Ligand für Siglecs eine Inhibition von Effektorzellen bewirken. Der anti-GD₂-Antikörper ch14.18 könnte diesen Effekt kompetitiv verhindern. Durch weitere Untersuchungen wie z. B. Behandlung mit der Protease Papain und damit Spaltung des Antikörpers in ein Fc-Fragment und zwei Fab-Fragmente ließe sich die Frage klären, welchen Anteil die ADCC am Wirkmechanismus des Antikörpers ausmacht. Um zu analysieren, ob GD₂ einen Liganden für Siglec-7 darstellt, wären Kompetitionsexperimente von anti-GD₂-Antikörpern mit Siglec-7-Tetrameren auf einer Zelllinie wie Sk-N-Be, die sowohl GD₂ als auch Siglec-7-Liganden exprimiert, denkbar. Auch ein Knock-Down der GD₂-Synthase mittels siRNA bietet sich zur Untersuchung dieser Frage an. Darüber hinaus bietet sich für Untersuchungen zum Gangliosid GD₃, das als Ligand für Siglec-7 beschrieben wurde, der monoklonale Antikörper Ha1 an. Dieser humane, anti-Disialosyl IgM Antikörper kann experimentell genutzt werden, um kompetitiv die Bindung von [Siglec-7]₄:SA-PE an seinen Liganden GD₃ zu unterbinden und vergleichende funktionelle Analysen zu ermöglichen.

5.13 Expression inhibitorischer Siglecs auf PBMC und Einfluss von Zytokinen

Analysen zur Expression von Siglecs auf T-Lymphozyten kommt eine bedeutende Rolle zu, um die Frage zu klären, ob der Einsatz von löslichen Siglecs für experimentelle Ansätze geeignet ist, die sich mit Eingriffen in T-Zell-vermittelte Immunantworten beschäftigen. Während einige Gruppen den Verlust der Siglec-

Expression auf T-Lymphozyten im Laufe der Evolution postulieren (Nguyen et al., 2006; Vitale et al., 1999), heben andere Gruppen eine spenderabhängige Expression auf Subpopulationen von T-Zellen, hauptsächlich auf die CD3 ϵ -Kette exprimierenden Zellen, $\alpha\beta$ T-Zellen nicht jedoch auf $\gamma\delta$ T-Zellen, hervor (Ikehara et al., 2004). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte mRNA von Siglec-7 und Siglec-9 durch PCR in CD8⁺ T-Lymphozyten (Siglec-7 27% nach densitometrischer Analyse der Banden im Vergleich zur Expression von GAPDH mRNA, Siglec-9 54%) sowie in geringerem Umfang in CD4⁺25⁻ (Siglec-7 2%, Siglec-9 9%) und CD4⁺25⁺ T-Lymphozyten (Siglec-7 3%, Siglec-9 22%) detektiert werden. Die Expression von Siglec-7 auf NK-Zellen und von Siglec-9 auf NK-Zellen und Monozyten konnten mit Hilfe der kommerziell erworbenen Antikörper bestätigt werden, die Expression auf Subpopulationen von CD8⁺ T-Lymphozyten jedoch nicht (Abb. 4.29 und Abb. 4.30). Aktivierung von Zellen geht mit einer Aktivierung von membranständigen Neuraminidasen und einer verringerten Expression von Sialinsäureresten auf der Zelle einher, so dass Siglecs für trans-Interaktionen mit anderen Zellen zur Verfügung stehen. Nguyen et al. zeigten, dass unspezifische Aktivierung mit PHA bei T-Zellen von Schimpansen, die viele Siglecs exprimieren, eine geringere T-Zellantwort bewirkt als bei humanen T-Zellen (Nguyen et al., 2006). Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben keine Veränderungen im Expressionsmuster der Rezeptoren Siglec-7 und Siglec-9 auf der Oberfläche von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation der Zellen mit IL-2/OKT3, PHA oder IFN γ .

5.14 Glykosylierungsmuster von Mamma- und Ovarial-Carcinomen

Veränderte Glykosylierungsmuster sind insbesondere in der Karzinogenese des Mamma-Carcinoms beschrieben worden (Hakim, 1988; Sewell et al., 2006).

Neben Tumorzell-basierten Vakzinen und Antigen-spezifischen Impfungen mit Peptid-, DNA- und RNA-Vakzinen werden auch Vakzinierungen gegen Karbohydrate in der Therapie des Mamma-Carcinoms erprobt. Der Impfstoff Theratope[®], der das MUC-1 assoziierte Karbohydrat Sialyl-Tn sowie key limpet haemocyanin (KLH) als Adjuvans erhält, zeigte in Phase I- und II-Studien humorale und zelluläre Immunantworten (Holmberg und Sandmaier, 2004), die jedoch in einer Phase III-Studie für Patientinnen mit metastasiertem Mamma-Carcinom nicht bestätigt werden konnten.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen Unterschiede im Sialylierungsmuster von 4 untersuchten Mamma-Carcinom- und 12 Ovarial-Carcinom-Linien, die von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Gückel (Universitäts-Frauenklinik, Tübingen) zur Verfügung gestellt wurden, auf (Tab. 4.2). Die Ergebnisse aus ersten vorläufigen funktionellen Assays verdeutlichen, dass Inkubation von Zellen der Mamma-Carcinom-Linie KS 24.22 mit rekombinantem Siglec-7 eine erhöhte spezifische Lyse in T-Zell-vermittelten Zytotoxizitätsassays bewirkt (Abb. 4.32). Weitergehende Untersuchungen sind von Bedeutung, um die Hypothese zu bestätigen, dass die Expression bestimmter Sialinsäuremodifikationen auf Oberflächenproteinen von Mamma-Carcinomzellen an Immunescape-Mechanismen dieser Zellen beteiligt sind.

5.15 Bewertung der Versuche und Ausblick

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde das Glykosylierungsmuster physiologischer und maligner Zellen mit Hilfe von pflanzlichen Lektinen untersucht. Darauf aufbauend konnte in der vorliegenden Arbeit die durchflusszytometrische Analyse mit Hilfe von rekombinanten Siglec-Tetrameren etabliert werden. Diese in der MHC-Forschung bereits eingesetzte Methode umgeht das Problem der niedrigen Affinität von Siglecs gegenüber ihren Liganden und stellt eine neue Möglichkeit dar, das Sialylierungsmuster maligner Zellen zu charakterisieren.

Bezüglich des Sialylierungsmusters von Leukämien konnte gezeigt werden, dass T-ALL-Blasten verstärkt Liganden für Siglec-7 exprimieren und mit Siglec-7 als Rezeptor auf der Oberfläche von Effektorzellen interagieren. In in vitro-Versuchen wurde durch Zugabe von rekombinantem Siglec-7 die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität sowohl gegen die klassische CML Linie K562 als Zielzellen als auch gegen primäre pädiatrische T-ALL Blasten gesteigert. Hierdurch wurde die Hypothese bestätigt, dass Sialinsäuremodifikationen auf Oberflächenproteinen maligner Zellen über eine Interaktion mit Siglecs eine Suppression von Effektorzellen bewirken können. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Anwendung rekombinanter Siglecs oder anderer Reagenzien wie z. B. Sialoglykan-spezifischer Antikörper KIR Liganden auf Tumorzellen absättigen und den Tumor für immunologische Therapien besser zugänglich machen könnten.

Die von weiteren Tumoren gewonnenen phänotypischen Erkenntnisse bezüglich der Sialylierung dieser Arbeit müssten auf ihre funktionelle Relevanz hin untersucht werden. Insbesondere ist es von Interesse, ob ein Immunescape durch Expression von Siglec-Liganden auch bei weiteren malignen Erkrankungen, insbesondere soliden Tumoren wie dem Neuroblastom und Mamma- bzw. Ovarialcarcinomen zu finden ist.

6 Zusammenfassung

Der Prozeß der Glykosylierung stellt eine bedeutende posttranslationale Modifikation von Proteinen dar. Veränderungen im Glykosylierungsmuster von Zellen entstehen zu einem frühen Zeitpunkt der malignen Transformation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Glykosylierungsmuster von Tumorzellen und der Einfluss der Sialylierung auf die Modulation von Immunantworten untersucht. Sialinsäurereste stellen die häufigsten terminalen Karbohydrate dar und binden an Siglecs, inhibitorische Rezeptoren, die sich auf Effektorzellen des Immunsystems finden. In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante Siglec-7- und Siglec-9-Tetramere generiert, die durchflusszytometrische Untersuchungen des zellulären Sialylierungsmusters ermöglichten. Liganden für Siglec-7 konnten auf humanen T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und einer Untergruppe von B-Zellen, die aktivierte und Gedächtnis-B-Zellen beinhaltet, detektiert werden. Vergleichend hierzu wurden phänotypische Untersuchungen maligner Zellen durchgeführt. Analysen mit Hilfe von Glykanarrays ergaben keine Unterschiede im Glykosylierungsmuster zwischen B-Zellen und cALL-Blasten. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit Siglec-Tetrameren zeigten jedoch, dass T-ALL-Blasten im Gegensatz zu cALL-Blasten eine Expression von Siglec-7 Liganden aufweisen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Sialoglykane auf der Oberfläche maligner Zellen als Liganden für Siglecs dienen und eine Inhibition von attackierenden Effektorzellen bewirken können. Als Modellsystem zur Untersuchung der Hypothese wurden K562, die ein klassisches NK-Zell-Target darstellen und Liganden für Siglec-7 exprimieren, eingesetzt. In Kompetitionsassays wurde die spezifische Lyse von K562 durch NK-Zellen nach Vorinkubation mit rekombinantem Siglec-7 gesteigert. Ähnliche Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn primäre leukämische T-ALL-Blasten als Zielzellen dienen

Um Vorarbeiten für die Übertragung dieser Ergebnisse auf weitere maligne Erkrankungen zu leisten, wurden Analysen des Sialylierungsmusters von Zelllinien aus Neuroblastomen, Mamma- und Ovarialcarcinomen durchgeführt. Zellen der Neuroblastomlinie SY5Y ergaben eine Expression von α 2,3-Sialinsäuren, nicht jedoch von α 2,6-Sialinsäuren. Wurden die Zellen mit den Neurotrophinrezeptoren Trk A oder Trk B transfiziert, so konnte eine erniedrigte Expression von α 2,3-

Sialinsäuren auf Trk B transfizierten Zellen und eine erhöhte Expression von α 2,6-Sialinsäuren auf Trk A und Trk B transfizierten Zellen im Vergleich zu Transfektionen mit dem Leervektor als Kontrolle detektiert werden. Liganden für Siglec-7 konnten - auch nach Stimulation mit IFN γ - nur schwach detektiert werden. Mamma- und Ovarial-Carcinom-Linien exprimierten α 2,3-Sialinsäuren, eine Expression von α 2,6-Sialinsäuren war hingegen nur auf 2 von 4 untersuchten Ovarial-Carcinom- und 2 von 12 Mamma-Carcinom-Zelllinien zu finden. Liganden für Siglec-7 fanden sich auf 2 Mamma-Carcinom-Linien und auf 3 Ovarial-Carcinom-Linien. In ersten vorläufigen funktionellen Assays wurde eine erhöhte spezifische Lyse von Zellen der Mammacarcinomlinie KS 24.22 nach Zugabe von rekombinantem Siglec-7 in T-Zell-vermittelten Zytotoxizitätsassays detektiert.

Darüber hinaus ergaben Analysen des Sialylierungsmuster immunregulatorischer Zellen, dass regulatorische T-Zellen und multipotente, mesenchymale Stromazellen Liganden für Siglec-7 auf der Oberfläche aufweisen. Dendritische Zellen regulierten im Laufe ihrer Reifung Liganden für Siglec-7 herunter.

Insgesamt wurde die Arbeitshypothese bestätigt, indem gezeigt wurde, dass Sialoglykane auf leukämischen Blasten als Liganden für Siglec-7 auf der Oberfläche von NK-Zellen, dienen können. Dies könnte einen neuen Mechanismus der Immunevasion von malignen Zellen darstellen. Nähere Erkenntnisse sind für die Immuntherapie unterschiedlicher maligner Erkrankungen von Interesse.

7 Literatur

- Agrawal, B., Gendler, S. J., and Longenecker, B. M. (1998). "The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy." *Mol. Med. Today*, 4(9), 397-403.
- Alpey, M. S., Attrill, H., Crocker, P. R., and van Aalten, D. M. (2003). "High resolution crystal structures of Siglec-7. Insights into ligand specificity in the Siglec family." *J. Biol. Chem.*, 278(5), 3372-3377.
- Angata, T. (2004). "[Functions and evolution of siglecs, a family of endogenous sialic acid receptors of vertebrates]." *Seikagaku*, 76(9), 1224-1228.
- Angata, T., Hayakawa, T., Yamanaka, M., Varki, A., and Nakamura, M. (2006). "Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates." *FASEB J.*, 20(12), 1964-1973.
- Attrill, H., Imamura, A., Sharma, R. S., Kiso, M., Crocker, P. R., and van Aalten, D. M. (2006). "Siglec-7 undergoes a major conformational change when complexed with the alpha(2,8)-disialylganglioside GT1b." *J. Biol. Chem.*, 281(43), 32774-32783.
- Avril, T., Floyd, H., Lopez, F., Vivier, E., and Crocker, P. R. (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(11), 6841-6849.
- Avril, T., Freeman, S. D., Attrill, H., Clarke, R. G., and Crocker, P. R. (2005). "Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation." *J. Biol. Chem.*, 280(20), 19843-19851.
- Avril, T., North, S. J., Haslam, S. M., Willison, H. J., and Crocker, P. R. (2006a). "Probing the cis interactions of the inhibitory receptor Siglec-7 with alpha2,8-disialylated ligands on natural killer cells and other leukocytes using glycan-specific antibodies and by analysis of alpha2,8-sialyltransferase gene expression." *J. Leukoc. Biol.*, 80(4), 787-796.
- Avril, T., Wagner, E. R., Willison, H. J., and Crocker, P. R. (2006b). "Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7 mediates selective recognition of sialylated glycans expressed on *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides." *Infect. Immun.*, 74(7), 4133-4141.
- Bakker, T. R., Piperi, C., Davies, E. A., and Merwe, P. A. (2002). "Comparison of CD22 binding to native CD45 and synthetic oligosaccharide." *Eur. J. Immunol.*, 32(7), 1924-1932.
- Barker, E., Mueller, B. M., Handgretinger, R., Herter, M., Yu, A. L., and Reisfeld, R. A. (1991). "Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells." *Cancer Res.*, 51(1), 144-149.

- Baum, L. G., Derbin, K., Perillo, N. L., Wu, T., Pang, M., and Uittenbogaart, C. (1996). "Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression." *J. Biol. Chem.*, 271(18), 10793-10799.
- Bax, M., Garcia-Vallejo, J. J., Jang-Lee, J., North, S. J., Gilmartin, T. J., Hernandez, G., Crocker, P. R., Leffler, H., Head, S. R., Haslam, S. M., Dell, A., and van, K. Y. (2007). "Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins." *J. Immunol.*, 179(12), 8216-8224.
- Blixt, O., Collins, B. E., van, d. N., I, Crocker, P. R., and Paulson, J. C. (2003). "Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein." *J. Biol. Chem.*, 278(33), 31007-31019.
- Blottiere, H. M., Burg, C., Zennadi, R., Perrin, P., Blanchardie, P., Bara, J., Meflah, K., and Le, P. J. (1992). "Involvement of histo-blood-group antigens in the susceptibility of colon carcinoma cells to natural killer-mediated cytotoxicity." *Int. J. Cancer*, 52(4), 609-618.
- Bochner, B. S., Alvarez, R. A., Mehta, P., Bovin, N. V., Blixt, O., White, J. R., and Schnaar, R. L. (2005). "Glycan array screening reveals a candidate ligand for Siglec-8." *J. Biol. Chem.*, 280(6), 4307-4312.
- Boog, C. J., Neefjes, J. J., Boes, J., Ploegh, H. L., and Melief, C. J. (1989). "Specific immune responses restored by alteration in carbohydrate chains of surface molecules on antigen-presenting cells." *Eur. J. Immunol.*, 19(3), 537-542.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and McMichael, A. J. (1998). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C." *Nature*, 391(6669), 795-799.
- Bresalier, R. S., Ho, S. B., Schoeppner, H. L., Kim, Y. S., Sleisenger, M. H., Brodt, P., and Byrd, J. C. (1996). "Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis." *Gastroenterology*, 110(5), 1354-1367.
- Brinkman-Van der Linden EC, and Varki, A. (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(12), 8625-8632.
- Brossart, P., Schneider, A., Dill, P., Schammann, T., Grunebach, F., Wirths, S., Kanz, L., Buhring, H. J., and Brugger, W. (2001). "The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes." *Cancer Res.*, 61(18), 6846-6850.
- Campanero-Rhodes, M. A., Childs, R. A., Kiso, M., Komba, S., Le, N. C., Warren, J., Otto, D., Crocker, P. R., and Feizi, T. (2006). "Carbohydrate microarrays reveal sulphation as a modulator of siglec binding." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 344(4), 1141-1146.

- Carlin, A. F., Lewis, A. L., Varki, A., and Nizet, V. (2007). "Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes." *J. Bacteriol.*, 189(4), 1231-1237.
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellon, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodriguez, A., Perez-Villar, J. J., Moretta, L., Moretta, A., and Lopez-Botet, M. (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules." *Eur. J. Immunol.*, 27(2), 563-567.
- Cebo, C., Da, R. S., Wittnebel, S., Turhan, A. G., Abdelali, J., Caillat-Zucman, S., Bourhis, J. H., Chouaib, S., and Caignard, A. (2006). "The decreased susceptibility of Bcr/Abl targets to NK cell-mediated lysis in response to imatinib mesylate involves modulation of NKG2D ligands, GM1 expression, and synapse formation." *J. Immunol.*, 176(2), 864-872.
- Chen, C., and Okayama, H. (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol. Cell Biol.*, 7(8), 2745-2752.
- Cheung, I. Y., Vickers, A., and Cheung, N. K. (2006). "Sialyltransferase STX (ST8Siall): a novel molecular marker of metastatic neuroblastoma." *Int. J. Cancer*, 119(1), 152-156.
- Cheung, N. K., Saarinen, U. M., Neely, J. E., Landmeier, B., Donovan, D., and Coccia, P. F. (1985). "Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells." *Cancer Res.*, 45(6), 2642-2649.
- Collins, B. E., Blixt, O., DeSieno, A. R., Bovin, N., Marth, J. D., and Paulson, J. C. (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(16), 6104-6109.
- Collins, B. E., Blixt, O., Han, S., Duong, B., Li, H., Nathan, J. K., Bovin, N., and Paulson, J. C. (2006). "High-affinity ligand probes of CD22 overcome the threshold set by cis ligands to allow for binding, endocytosis, and killing of B cells." *J. Immunol.*, 177(5), 2994-3003.
- Crocker, P. R. (2002). "Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling." *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12(5), 609-615.
- Crocker, P. R. (2005). "Siglecs in innate immunity." *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5(4), 431-437.
- Crocker, P. R., Freeman, S., Gordon, S., and Kelm, S. (1995). "Sialoadhesin binds preferentially to cells of the granulocytic lineage." *J. Clin. Invest.*, 95(2), 635-643.
- Crocker, P. R., Kelm, S., Hartnell, A., Freeman, S., Nath, D., Vinson, M., and Mucklow, S. (1996). "Sialoadhesin and related cellular recognition molecules of the immunoglobulin superfamily." *Biochem. Soc. Trans.*, 24(1), 150-156.
- Crocker, P. R., Paulson, J. C., and Varki, A. (2007). "Siglecs and their roles in the immune system." *Nat. Rev. Immunol.*, 7(4), 255-266.

- Crocker, P. R., and Varki, A. (2001). "Siglecs, sialic acids and innate immunity." *Trends Immunol.*, 22(6), 337-342.
- Crocker, P. R., Vinson, M., Kelm, S., and Drickamer, K. (1999). "Molecular analysis of sialoside binding to sialoadhesin by NMR and site-directed mutagenesis." *Biochem. J.*, 341 (Pt 2), 355-361.
- Curtsinger, J. M., Lins, D. C., and Mescher, M. F. (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(7), 3236-3243.
- da-Nagai, K., Fujita, K., Fujime, M., Nakatsugawa, S., Ishigaki, T., and Irimura, T. (2000). "Absence of correlation of MUC1 expression to malignant behavior of renal cell carcinoma in experimental systems." *Clin. Exp. Metastasis*, 18(1), 77-81.
- Dahms, N. M., and Hancock, M. K. (2002). "P-type lectins." *Biochim. Biophys. Acta*, 1572(2-3), 317-340.
- Dall'Olio, F., and Chiricolo, M. (2001). "Sialyltransferases in cancer." *Glycoconj. J.*, 18(11-12), 841-850.
- Dall'Olio, F., Mariani, E., Tarozzi, A., Meneghetti, A., Chiricolo, M., Lau, J. T., and Facchini, A. (1997). "Expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase does not alter the susceptibility of human colon cancer cells to NK-mediated cell lysis." *Glycobiology*, 7(4), 507-513.
- Dall'Olio, F., and Trere, D. (1993). "Expression of alpha 2,6-sialylated sugar chains in normal and neoplastic colon tissues. Detection by digoxigenin-conjugated Sambucus nigra agglutinin." *Eur. J. Histochem.*, 37(3), 257-265.
- Daniels, M. A., Hogquist, K. A., and Jameson, S. C. (2002). "Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses." *Nat. Immunol.*, 3(10), 903-910.
- Davey, G. M., Schober, S. L., Endrizzi, B. T., Dutcher, A. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (1998). "Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells." *J. Exp. Med.*, 188(10), 1867-1874.
- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J. W. (2001). "Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation." *Nature*, 409(6821), 733-739.
- Dengjel, J., Rammensee, H. G., and Stevanovic, S. (2005). "Glycan side chains on naturally presented MHC class II ligands." *J. Mass Spectrom.*, 40(1), 100-104.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." *J. Exp. Med.*, 193(2), 233-238.
- Dimasi, N., Moretta, L., Biassoni, R., and Mariuzza, R. A. (2003). "Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the extracellular IgV-

- like domain of the human natural killer cell inhibitory receptor p75/AIRM1." *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 59(Pt 10), 1856-1858.
- Drickamer, K. (1988). "Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins." *J. Biol. Chem.*, 263(20), 9557-9560.
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., and Munz, C. (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." *J. Exp. Med.*, 195(3), 343-351.
- Fibbe, W. E., Nauta, A. J., and Roelofs, H. (2007). "Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells." *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1106, 272-278.
- Figdor, C. G., van, K. Y., and Adema, G. J. (2002). "C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells." *Nat. Rev. Immunol.*, 2(2), 77-84.
- Fischer, K., Andreesen, R., and Mackensen, A. (2002). "An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity." *J. Immunol. Methods*, 259(1-2), 159-169.
- Freeman, S. D., Kelm, S., Barber, E. K., and Crocker, P. R. (1995). "Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules." *Blood*, 85(8), 2005-2012.
- Fuster, M. M., and Esko, J. D. (2005). "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets." *Nat. Rev. Cancer*, 5(7), 526-542.
- Gajewski, T. F. (2006). "Identifying and overcoming immune resistance mechanisms in the melanoma tumor microenvironment." *Clin. Cancer Res.*, 12(7 Pt 2), 2326s-2330s.
- Gajewski, T. F., Meng, Y., and Harlin, H. (2006). "Immune suppression in the tumor microenvironment." *J. Immunother. (1997.)*, 29(3), 233-240.
- Galli-Stampino, L., Meinjohanns, E., Frische, K., Meldal, M., Jensen, T., Werdelin, O., and Mouritsen, S. (1997). "T-cell recognition of tumor-associated carbohydrates: the nature of the glycan moiety plays a decisive role in determining glycopeptide immunogenicity." *Cancer Res.*, 57(15), 3214-3222.
- Galvan, M., Murali-Krishna, K., Ming, L. L., Baum, L., and Ahmed, R. (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(2), 641-648.
- Gerloni, M., Castiglioni, P., and Zanetti, M. (2005). "The cooperation between two CD4 T cells induces tumor protective immunity in MUC.1 transgenic mice." *J. Immunol.*, 175(10), 6551-6559.
- Ghosh, S., Bandyopadhyay, S., Mukherjee, K., Mallick, A., Pal, S., Mandal, C., Bhattacharya, D. K., and Mandal, C. (2007). "O-acetylation of sialic acids is required for the survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)." *Glycoconj. J.*, 24(1), 17-24.

- Gieseke, F., Schutt, B., Viebahn, S., Koscielniak, E., Friedrich, W., Handgretinger, R., and Muller, I. (2007). "Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN γ R1 signaling and IDO expression." *Blood*, 110(6), 2197-2200.
- Gillespie, W., Paulson, J. C., Kelm, S., Pang, M., and Baum, L. G. (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(6), 3801-3804.
- Grünewald, S., Matthijs, G., and Jaeken, J. (2002). "Congenital disorders of glycosylation: a review." *Pediatr. Res.*, 52(5), 618-624.
- Guilloux, Y., Viret, C., Gervois, N., Le, D. E., Pandolfino, M. C., Diez, E., and Jotereau, F. (1994). "Defective lymphokine production by most CD8+ and CD4+ tumor-specific T cell clones derived from human melanoma-infiltrating lymphocytes in response to autologous tumor cells in vitro." *Eur. J. Immunol.*, 24(9), 1966-1973.
- Hakim, A. A. (1988). "A mechanism by which human breast carcinoma cells escape the host immune system." *Neoplasma*, 35(6), 691-705.
- Hakomori, S. (2002). "Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(16), 10231-10233.
- Hakomori, S. (1996). "Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism." *Cancer Res.*, 56(23), 5309-5318.
- Hamerman, J. A., Jarjoura, J. R., Humphrey, M. B., Nakamura, M. C., Seaman, W. E., and Lanier, L. L. (2006). "Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12." *J. Immunol.*, 177(4), 2051-2055.
- Hanski, C., Klussmann, E., Wang, J., Bohm, C., Ogorek, D., Hanski, M. L., Kruger-Krasagakes, S., Eberle, J., Schmitt-Graff, A., and Riecken, E. O. (1996). "Fucosyltransferase III and sialyl-Le(x) expression correlate in cultured colon carcinoma cells but not in colon carcinoma tissue." *Glycoconj. J.*, 13(5), 727-733.
- Harrington, L. E., Galvan, M., Baum, L. G., Altman, J. D., and Ahmed, R. (2000). "Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans." *J. Exp. Med.*, 191(7), 1241-1246.
- Hatam, L., Schuval, S., and Bonagura, V. R. (1994). "Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay." *Cytometry*, 16(1), 59-68.
- Hollingsworth, M. A., and Swanson, B. J. (2004). "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface." *Nat. Rev. Cancer*, 4(1), 45-60.
- Holmberg, L. A., and Sandmaier, B. M. (2004). "Vaccination with Theratope (STn-KLH) as treatment for breast cancer." *Expert. Rev. Vaccines.*, 3(6), 655-663.

- Ikehara, Y., Ikehara, S. K., and Paulson, J. C. (2004). "Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9." *J. Biol. Chem.*, 279(41), 43117-43125.
- Ito, H., Hiraiwa, N., Sawada-Kasugai, M., Akamatsu, S., Tachikawa, T., Kasai, Y., Akiyama, S., Ito, K., Takagi, H., and Kannagi, R. (1997). "Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-transferases in human colorectal cancer tissues." *Int. J. Cancer*, 71(4), 556-564.
- Itzkowitz, S. H., Bloom, E. J., Kokal, W. A., Modin, G., Hakomori, S., and Kim, Y. S. (1990). "Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients." *Cancer*, 66(9), 1960-1966.
- Jenner, J., Kerst, G., Handgretinger, R., and Muller, I. (2006). "Increased alpha2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells." *Exp. Hematol.*, 34(9), 1212-1218.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." *J. Exp. Med.*, 193(11), 1285-1294.
- Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002). "Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation." *Cell*, 111(6), 837-851.
- Kakugawa, Y., Wada, T., Yamaguchi, K., Yamanami, H., Ouchi, K., Sato, I., and Miyagi, T. (2002). "Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(16), 10718-10723.
- Kanazawa, N. (2007). "Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells." *J. Dermatol. Sci.*, 45(2), 77-86.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2006). "Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation." *Science*, 313(5787), 670-673.
- Kelm, S., Gerlach, J., Brossmer, R., Danzer, C. P., and Nitschke, L. (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(9), 1207-1213.
- Kelm, S., and Schauer, R. (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." *Int. Rev. Cytol.*, 175, 137-240.
- Khong, H. T., and Restifo, N. P. (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat. Immunol.*, 3(11), 999-1005.
- Kojima, N., Handa, K., Newman, W., and Hakomori, S. (1992). "Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182(3), 1288-1295.

- Kopitz, J., von, R. C., Burchert, M., Cantz, M., and Gabius, H. J. (1998). "Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture." *J. Biol. Chem.*, 273(18), 11205-11211.
- Kudo, T., Ikehara, Y., Togayachi, A., Morozumi, K., Watanabe, M., Nakamura, M., Nishihara, S., and Narimatsu, H. (1998). "Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer." *Lab Invest*, 78(7), 797-811.
- Lanoue, A., Batista, F. D., Stewart, M., and Neuberger, M. S. (2002). "Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity?" *Eur. J. Immunol.*, 32(2), 348-355.
- Lee-MacAry, A. E., Ross, E. L., Davies, D., Laylor, R., Honeychurch, J., Glennie, M. J., Snary, D., and Wilkinson, R. W. (2001). "Development of a novel flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay using the fluorophores PKH-26 and TO-PRO-3 iodide." *J. Immunol. Methods*, 252(1-2), 83-92.
- Lis, H., and Sharon, N. (1998). "Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition." *Chem. Rev.*, 98(2), 637-674.
- Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, S. H., and Crocker, P. R. (2004). "Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells." *Immunobiology*, 209(1-2), 199-207.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." *Immunity*, 26(4), 503-517.
- May, A. P., Robinson, R. C., Vinson, M., Crocker, P. R., and Jones, E. Y. (1998). "Crystal structure of the N-terminal domain of sialoadhesin in complex with 3' sialyllactose at 1.85 Å resolution." *Mol. Cell*, 1(5), 719-728.
- Metzler, M., Gertz, A., Sarkar, M., Schachter, H., Schrader, J. W., and Marth, J. D. (1994). "Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development." *EMBO J.*, 13(9), 2056-2065.
- Mingari, M. C., Vitale, C., Romagnani, C., Falco, M., and Moretta, L. (2001). "p75/AIRM1 and CD33, two sialoadhesin receptors that regulate the proliferation or the survival of normal and leukemic myeloid cells." *Immunol. Rev.*, 181, 260-268.
- Miyazaki, K., Ohmori, K., Izawa, M., Koike, T., Kumamoto, K., Furukawa, K., Ando, T., Kiso, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Yoshida, A., Takeuchi, M., and Kannagi, R. (2004). "Loss of disialyl Lewis(a), the ligand for lymphocyte inhibitory receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (Siglec-7) associated with increased sialyl Lewis(a) expression on human colon cancers." *Cancer Res.*, 64(13), 4498-4505.

- Monteiro, V. G., Lobato, C. S., Silva, A. R., Medina, D. V., de Oliveira, M. A., Seabra, S. H., de, S. W., and DaMatta, R. A. (2005). "Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages." *Parasitol. Res.*, 97(5), 380-385.
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M. C., and Moretta, A. (2006). "Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions." *Immunol. Rev.*, 214, 219-228.
- Mukherjee, P., Ginardi, A. R., Madsen, C. S., Tinder, T. L., Jacobs, F., Parker, J., Agrawal, B., Longenecker, B. M., and Gendler, S. J. (2001). "MUC1-specific CTLs are non-functional within a pancreatic tumor microenvironment." *Glycoconj. J.*, 18(11-12), 931-942.
- Mulder, W. M., Stukart, M. J., de, W. E., Wagstaff, J., Scheper, R. J., and Bloemena, E. (1996). "Mucin-1-related T cell infiltration in colorectal carcinoma." *Cancer Immunol. Immunother.*, 42(6), 351-356.
- Müller, I., Jenner, J., Handgretinger, R., Riberdy, J., and Kerst, G. (2004). "Glycosylation and lectins-examples of immunosurveillance and immune evasion." *Histol. Histopathol.*, 19(2), 527-533.
- Münz, C., Dao, T., Ferlazzo, G., de Cos, M. A., Goodman, K., and Young, J. W. (2005). "Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells." *Blood*, 105(1), 266-273.
- Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itohara, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., and Kozutsumi, Y. (2007). "Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation." *Mol. Cell Biol.*, 27(8), 3008-3022.
- Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsushita, Y., and Irimura, T. (1993). "Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study." *Cancer Res.*, 53(15), 3632-3637.
- Narayanan, S. (1994). "Sialic acid as a tumor marker." *Ann. Clin. Lab Sci.*, 24(4), 376-384.
- Nemoto-Sasaki, Y., Mitsuki, M., Morimoto-Tomita, M., Maeda, A., Tsuiji, M., and Irimura, T. (2001). "Correlation between the sialylation of cell surface Thomsen-Friedenreich antigen and the metastatic potential of colon carcinoma cells in a mouse model." *Glycoconj. J.*, 18(11-12), 895-906.
- Nguyen, D. H., Hurtado-Ziola, N., Gagneux, P., and Varki, A. (2006). "Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(20), 7765-7770.
- Nicoll, G., Avril, T., Lock, K., Furukawa, K., Bovin, N., and Crocker, P. R. (2003). "Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity

- via siglec-7-dependent and -independent mechanisms." *Eur. J. Immunol.*, 33(6), 1642-1648.
- Nicoll, G., Ni, J., Liu, D., Klenerman, P., Munday, J., Dubock, S., Mattei, M. G., and Crocker, P. R. (1999). "Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes." *J. Biol. Chem.*, 274(48), 34089-34095.
- Nitschke, L., Floyd, H., Ferguson, D. J., and Crocker, P. R. (1999). "Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells." *J. Exp. Med.*, 189(9), 1513-1518.
- O'Boyle, K. P., Freeman, K., Kalisiak, A., Agregado, A., and Scheinberg, D. A. (1996). "Patterns of ganglioside expression in B cell neoplasms." *Leuk. Lymphoma*, 21(3-4), 255-266.
- Ogata, S., Maimonis, P. J., and Itzkowitz, S. H. (1992). "Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity." *Cancer Res.*, 52(17), 4741-4746.
- Okada, M., Furukawa, K., Yamashiro, S., Yamada, Y., Haraguchi, M., Horibe, K., Kato, K., Tsuji, Y., and Furukawa, K. (1996). "High expression of ganglioside alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene in adult T-cell leukemia cells unrelated to the gene expression of human T-lymphotropic virus type I." *Cancer Res.*, 56(12), 2844-2848.
- Orr, S. J., Morgan, N. M., Buick, R. J., Boyd, C. R., Elliott, J., Burrows, J. F., Jefferies, C. A., Crocker, P. R., and Johnston, J. A. (2007). "SOCS3 targets Siglec 7 for proteasomal degradation and blocks Siglec 7-mediated responses." *J. Biol. Chem.*, 282(6), 3418-3422.
- Otto, M., Barfield, R. C., Martin, W. J., Iyengar, R., Leung, W., Leimig, T., Chaleff, S., Gillies, S. D., and Handgretinger, R. (2005). "Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma." *Clin. Cancer Res.*, 11(23), 8486-8491.
- Overwijk, W. W. (2005). "Breaking tolerance in cancer immunotherapy: time to ACT." *Curr. Opin. Immunol.*, 17(2), 187-194.
- Pappu, B. P., and Shrikant, P. A. (2004). "Alteration of cell surface sialylation regulates antigen-induced naive CD8+ T cell responses." *J. Immunol.*, 173(1), 275-284.
- Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., and . (1985). "Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG." *Nature*, 316(6027), 452-457.
- Patel, N., Brinkman-Van der Linden EC, Altmann, S. W., Gish, K., Balasubramanian, S., Timans, J. C., Peterson, D., Bell, M. P., Bazan, J. F., Varki, A., and Kastelein, R. A. (1999). "OB-BP1/Siglec-6. a leptin- and sialic acid-binding

- protein of the immunoglobulin superfamily." *J. Biol. Chem.*, 274(32), 22729-22738.
- Petretti, T., Schulze, B., Schlag, P. M., and Kemmner, W. (1999). "Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human gastric carcinomas." *Biochim. Biophys. Acta*, 1428(2-3), 209-218.
- Powell, L. D., and Varki, A. (1994). "The oligosaccharide binding specificities of CD22 beta, a sialic acid-specific lectin of B cells." *J. Biol. Chem.*, 269(14), 10628-10636.
- Priatel, J. J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons, C. J., Richardson, K. B., Page, D. M., Fukuda, M., Varki, N. M., and Marth, J. D. (2000). "The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis." *Immunity.*, 12(3), 273-283.
- Raedler, A., and Schreiber, S. (1988). "Analysis of differentiation and transformation of cells by lectins." *Crit Rev. Clin. Lab Sci.*, 26(2), 153-193.
- Rapoport, E., Mikhalyov, I., Zhang, J., Crocker, P., and Bovin, N. (2003). "Ganglioside binding pattern of CD33-related siglecs." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13(4), 675-678.
- Ravetch, J. V., and Lanier, L. L. (2000). "Immune inhibitory receptors." *Science*, 290(5489), 84-89.
- Rosenberg, S. A. (2001). "Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer." *J. Intern. Med.*, 250(6), 462-475.
- Rudd, P., Fortune, F., Lehner, T., Parekh, R., Patel, T., Wormald, M., Malhotra, R., Sim, R., and Dwek, R. (1995). "Lectin-carbohydrate interactions in disease. T-cell recognition of IgA and IgD; mannose binding protein recognition of IgG0." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 376, 147-152.
- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Huang, M., Mattsson, N., Speir, J. A., DiGennaro, J. A., Fetrow, J. S., Dwek, R. A., and Wilson, I. A. (1999). "Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition." *J. Mol. Biol.*, 293(2), 351-366.
- Sata, T., Roth, J., Zuber, C., Stamm, B., and Heitz, P. U. (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(6), 1435-1448.
- Schrauder, A., Reiter, A., Gadner, H., Niethammer, D., Klingebiel, T., Kremens, B., Peters, C., Ebell, W., Zimmermann, M., Niggli, F., Ludwig, W. D., Riehm, H., Welte, K., and Schrappe, M. (2006). "Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95." *J. Clin. Oncol.*, 24(36), 5742-5749.

- Schulz, G., Cheresch, D. A., Varki, N. M., Yu, A., Staffileno, L. K., and Reisfeld, R. A. (1984). "Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients." *Cancer Res.*, 44(12 Pt 1), 5914-5920.
- Schwartz, A. L. (1984). "The hepatic asialoglycoprotein receptor." *CRC Crit Rev. Biochem.*, 16(3), 207-233.
- Seales, E. C., Shaikh, F. M., Woodard-Grice, A. V., Aggarwal, P., McBrayer, A. C., Hennessy, K. M., and Bellis, S. L. (2005). "A protein kinase C/Ras/ERK signaling pathway activates myeloid fibronectin receptors by altering beta1 integrin sialylation." *J. Biol. Chem.*, 280(45), 37610-37615.
- Seidenfaden, R., Krauter, A., Schertzinger, F., Gerardy-Schahn, R., and Hildebrandt, H. (2003). "Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions." *Mol. Cell Biol.*, 23(16), 5908-5918.
- Sewell, R., Backstrom, M., Dalziel, M., Gschmeissner, S., Karlsson, H., Noll, T., Gatgens, J., Clausen, H., Hansson, G. C., Burchell, J., and Taylor-Papadimitriou, J. (2006). "The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer." *J. Biol. Chem.*, 281(6), 3586-3594.
- Sharon, N., and Lis, H. (2004). "History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules." *Glycobiology*, 14(11), 53R-62R.
- Simon, T., Hero, B., Faldum, A., Handgretinger, R., Schrappe, M., Niethammer, D., and Berthold, F. (2004). "Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma." *J. Clin. Oncol.*, 22(17), 3549-3557.
- Sinclair, N. R. (2000). "Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs on activating molecules." *Crit Rev. Immunol.*, 20(2), 89-102.
- Singhal, A., Fohn, M., and Hakomori, S. (1991). "Induction of alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine (Tn) antigen-mediated cellular immune response for active immunotherapy in mice." *Cancer Res.*, 51(5), 1406-1411.
- Springer, G. F. (1995). "T and Tn pancarcinoma markers: autoantigenic adhesion molecules in pathogenesis, prebiopsy carcinoma-detection, and long-term breast carcinoma immunotherapy." *Crit Rev. Oncog.*, 6(1), 57-85.
- Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., and Long, E. O. (2003). "Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity." *Mol. Cell Biol.*, 23(17), 6291-6299.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 685-711.
- Studený, M., Marini, F. C., Dembinski, J. L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B. N., Champlin, R. E., and Andreeff, M. (2004). "Mesenchymal stem

- cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents." *J. Natl. Cancer Inst.*, 96(21), 1593-1603.
- Taylor, V. C., Buckley, C. D., Douglas, M., Cody, A. J., Simmons, D. L., and Freeman, S. D. (1999). "The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2." *J. Biol. Chem.*, 274(17), 11505-11512.
- Tedder, T. F., Poe, J. C., and Haas, K. M. (2005). "CD22: A Multifunctional Receptor That Regulates B Lymphocyte Survival and Signal Transduction." *Adv. Immunol.*, 88, 1-50.
- Toscano, M. A., Bianco, G. A., Ilarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G., and Rabinovich, G. A. (2007). "Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death." *Nat. Immunol.*, 8(8), 825-834.
- Varki, A., and Angata, T. (2006). "Siglecs--the major subfamily of I-type lectins." *Glycobiology*, 16(1), 1R-27R.
- Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L., and Steenbergen, S. M. (2004). "Diversity of microbial sialic acid metabolism." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(1), 132-153.
- Vitale, C., Romagnani, C., Falco, M., Ponte, M., Vitale, M., Moretta, A., Bacigalupo, A., Moretta, L., and Mingari, M. C. (1999). "Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(26), 15091-15096.
- Vitale, C., Romagnani, C., Puccetti, A., Olive, D., Costello, R., Chiossone, L., Pitto, A., Bacigalupo, A., Moretta, L., and Mingari, M. C. (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(10), 5764-5769.
- von Gunten, S., Vogel, M., Schaub, A., Stadler, B. M., Miescher, S., Crocker, P. R., and Simon, H. U. (2007). "Intravenous immunoglobulin preparations contain anti-Siglec-8 autoantibodies." *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119(4), 1005-1011.
- von Gunten, S., Yousefi, S., Seitz, M., Jakob, S. M., Schaffner, T., Seger, R., Takala, J., Villiger, P. M., and Simon, H. U. (2005). "Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment." *Blood*, 106(4), 1423-1431.
- Weis, W. I., and Drickamer, K. (1996). "Structural basis of lectin-carbohydrate recognition." *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 441-473.
- Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2005). "Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance." *Nature*, 437(7055), 141-146.
- Wolf, A. M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Grubeck-Loebenstien, B. (2003). "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients." *Clin. Cancer Res.*, 9(2), 606-612.

- Wu, W., Harley, P. H., Punt, J. A., Sharrow, S. O., and Kearse, K. P. (1996). "Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes." *J. Exp. Med.*, 184(2), 759-764.
- Yogeeswaran, G., Gronberg, A., Hansson, M., Dalianis, T., Kiessling, R., and Welsh, R. M. (1981). "Correlation of glycosphingolipids and sialic acid in YAC-1 lymphoma variants with their sensitivity to natural killer-cell-mediated lysis." *Int. J. Cancer*, 28(4), 517-526.
- Yoshimura, M., Ihara, Y., Matsuzawa, Y., and Taniguchi, N. (1996). "Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis." *J. Biol. Chem.*, 271(23), 13811-13815.
- Yoshimura, M., Ihara, Y., and Taniguchi, N. (1995). "Changes of beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) in patients with leukaemia." *Glycoconj. J.*, 12(3), 234-240.
- Zaccai, N. R., May, A. P., Robinson, R. C., Burtnick, L. D., Crocker, P. R., Brossmer, R., Kelm, S., and Jones, E. Y. (2007). "Crystallographic and in silico analysis of the sialoside-binding characteristics of the Siglec sialoadhesin." *J. Mol. Biol.*, 365(5), 1469-1479.
- Zimmermann, S. Y., Esser, R., Rohrbach, E., Klingebiel, T., and Koehl, U. (2005). "A novel four-colour flow cytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemic cells in peripheral or bone marrow specimens containing greater than 20% of normal cells." *J. Immunol. Methods*, 296(1-2), 63-76.

Abkürzungen und Synonyme

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
AG	Arbeitsgruppe
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
Asn	Asparagin
BCR	B-Zell-Rezeptor
BES	<i>N,N</i> -Bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CDG	Congenital disorder of glycosylation
CMP	Cytosinmonophosphat
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
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat

Abkürzungen

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
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
kDA	Kilo Dalton
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MAL II	Maackia amurensis Lektin II
Man	Mannose
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MNC	Mononukleäre Zellen
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MWCO	Molecular weight cut-off
NAcGlc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriessigsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (Phosphate buffered saline)

Abkürzungen

PE	(R)-Phycoerythrin
RPMI	Zellkulturmedium (am „Roswell Park Memorial Institute“ entwickelt)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
Sia	Sialinsäure
Siglec-7 ^{biot} , Siglec-9 ^{biot}	Biotinyliertes Siglec-7- oder Siglec-9- Fusionsprotein
Siglec-7 ^{ext} , Siglec-9 ^{ext}	Siglec-7- oder Siglec-9-Fusionsprotein (extrazellulärer Siglec-7- oder Siglec-9- Anteil)
[Siglec-7] ₄ : SA-PE, [Siglec-9] ₄ : SA-PE	Tetramerisiertes Siglec-7- oder Siglec-9- Fusionsprotein
SNL	Sambucus nigra 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
Thr	Threonin
TLR	Toll-like receptor
T _{reg}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
Well	Vertiefung einer Zellkulturplatte
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Publikationen

Originalarbeiten

Viebahn S, Gieseke F, Pfeiffer M, Handgretinger R, Müller I: Childhood T-ALL but not cALL blasts express Siglec-7 ligands inhibiting NK-cell mediated lysis. Submitted

Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz M.P., Horwitz E.M., Conte P, Handgretinger R, Dominici M: Animal Serum-Free Culture Conditions for Isolation and Expansion of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Human Bone Marrow, Cytotherapy 2006, 8: 437-44.

Gieseke F, Schütt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, Müller I: Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMC independently of IFN-gamma-R1- signaling and IDO expression, Blood 2007, 110: 2197-200.

Kongressbeiträge

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; Klin Pädiatr 2005, 217.

Staiber A, Kordowich S, Viebahn S, Niethammer D, Müller I. Mesenchymal stem cells as tools for bone marrow transplantation in paediatric patients. XVIII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede 2005; Klin Pädiatr 2005, 217.

Viebahn S, Jenner J, Gieseke F, Handgretinger R, Müller I. Characteristic sialylation patterns of cell surface proteins in immune-privileged cells. 36. Jahrestagung der deutschen und skandinavischen Gesellschaft für Immunologie, Kiel 2005; Immunobiology 2005, 209: 316.

Viebahn S, Gieseke F, Handgretinger R, Müller I. Siglec-7 ligand expression on leukemic blasts inhibits NK-cell mediated lysis. XIX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede 2006; Klin Pädiatr 2006, 218.

Gieseke F, Viebahn S, Kordowich S, Handgretinger R, Müller I. Potential role of lectins in the inhibition of T cells by mesenchymal stem cells. XIX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede 2006; Klin Pädiatr 2006, 218.

Gieseke F, Viebahn S, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMC in the absence of functional IFN γ 1 and IDO expression. 48th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology, Orlando 2006; Blood 2006, 108: 2567.

Viebahn S, Gieseke F, Pfeiffer M, Handgretinger R, Müller I. Pediatric T-ALL but not cALL blasts express ligands for siglec-7 inhibiting NK cell mediated lysis. 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando 2006; Blood 2006, 108: 1844.

Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

- Dr. Ingo Müller für die sehr gute Betreuung der Arbeit, seinen großen persönlichen Einsatz, die vielen wissenschaftlichen Hilfen und Anregungen, die von ihm geschaffene exzellente Atmosphäre und die zahlreichen Unternehmungen mit der Arbeitsgruppe.
- Prof. Dr. Gernot Bruchelt für die stetige Unterstützung und die Hilfestellungen bei der Entstehung dieser Arbeit.
- Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Mitbetreuung dieser Arbeit, das Erstellen des Gutachtens sowie insbesondere für seine Arbeit im Graduiertenkolleg 794.
- Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Roland Brock, PD Dr. Brigitte Gückel, Prof. Dr. Stefan Stevanović, Dr. Eva Tolosa, Prof. Dr. Angelika Eggert und der Firma Qiagen für die gute Zusammenarbeit innerhalb der Kooperationsprojekte.
- Allen Mitgliedern des Graduiertenkolleg 794 „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ der DFG für die inspirierende Atmosphäre und die interessanten Veranstaltungen.
- Allen Mitarbeitern der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Tübingen, insbesondere:
Jutta Zwicker, Friederike Gieseke, Alexandra Staiber, Sandra Kordowich, Nina Bergold, Markus Haug, Carsten Schepp, Markus Müller, Gesa Isensee, Christina Holzwarth, Martin Vaegler, Nadine Kemmler, Iris Schwantzer, Irena Straub, Nadja Fischer, Pascal Johann, Philippa Mang, Simon Lühl, Nicole Bieder, Andreas Kimminich, Luciana Dannecker, Maria Pechan, Claudia Treuner, Ursula Holzer, Nikolay Tzaribachev, Matthias Pfeiffer, Gunter Kerst, Michaela Döhring und Ramazan Sünbül für die zahlreichen Hilfestellungen, die unterhaltsamen Kaffee- und Schnittchenpausen und die vielen tollen Unternehmungen.
- Meinen Eltern, Martin und meinen Geschwistern Cornelia und Ulrike für die hervorragende, kontinuierliche Unterstützung und die vielen Motivationshilfen.
- Dem Förderverein krebskranker Kinder, Tübingen e.V., dem Fortüne-Programm der Universitätsklinik Tübingen und dem Graduiertenkolleg 794 der DFG für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Lebenslauf

Susanne Viebahn, geb. am 16.03.1979 in Köln

- 1989 - 1998 Besuch des Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Köln
- 1998 Allgemeine Hochschulreife
- 1998 - 1999 Humanmedizinstudium an der Albertus-Magnus Universität, Köln
- 1999 Studium der Molekularen Medizin an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen / Nürnberg
- 03/2001 Praktikum am MPI für neurologische Forschung, Köln
- 09/2001 Vordiplom Molekulare Medizin
- 09/2002 - 03/2003 Studium an der University of St Andrews, Schottland
Praktikum am dortigen Centre for Biomolecular Sciences in der Arbeitsgruppe von Dr. Randall
- 02-03/2003 Praktikum bei Elsevier Science, Medical Education, Edinburgh
- 09-10/2003 Diplomprüfung Molekulare Medizin in den Fächern Immunologie, Humangenetik, Molekulare Zellfunktionen und Molekulare Pathomechanismen
- 11/2003 - 05/2004 Diplomarbeit am Institut für klinische Immunologie an der Med. Klinik III, Erlangen mit dem Thema „Herstellung und funktionelle Charakterisierung eines bispezifischen Bibodies [CD89 x HLA-II] zur Effektorzell-vermittelten Lyse maligner B-Zellen“ unter Leitung von Prof. H.-M. Jäck
- 08/2004 – 08/2007 Naturwissenschaftliche Promotionsstelle an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen zum Thema „Die Rolle der Oberflächensialylierung bei der Modulation von Immunantworten“ unter Anleitung von Dr. Ingo Müller und Prof. Dr. Gernot Bruchelt. Mitbetreuung durch Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee. Förderung der Arbeit durch den Förderverein krebskranker Kinder, Tübingen e.V., das Fortüne-Programm der Universitätsklinik Tübingen und das Graduiertenkolleg 794 „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ der DFG.
- 10/2007 Traineeestelle im Bereich Life Science beim Verlag Wiley-VCH, Weinheim

