

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Charakterisierung des Proteins P275 in dendritischen
Zellen**

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

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

**vorgelegt von
Daniel Kurz
aus Stuttgart**

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Sinzger

Meinen Eltern
und
Angelika

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

1 Einleitung 1

1.1 Das Immunsystem..... 1

1.1.1 Das angeborene Immunsystem 1

1.1.2 Das erworbene Immunsystem..... 2

1.2 Zellen des Immunsystems..... 2

1.2.1 Dendritische Zellen (DC) 3

1.2.1.1 Subtypen dendritischer Zellen 5

1.2.2 Monozyten..... 7

1.2.3 Lymphozyten 7

1.2.3.1 B-Lymphozyten..... 8

1.2.3.2 T-Lymphozyten..... 9

1.3 Zytokine und Chemokine..... 10

1.4 Proteinbiosynthese 11

1.5 Membranständige Transportproteine 12

1.5.1 Transportproteine der SLC (solute carrier) - Familien 13

1.6 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels cDNA
Subtraktion 14

1.7 Das Protein P275 15

1.7.1 Natriumgekoppelter neutraler Aminosäure (System N/A)
Transporter der SLC38 Genfamilie..... 18

1.8 Antikörperherstellung 18

1.9 Zielsetzung der Arbeit 19

2 Material..... 21

2.1 Geräte 21

2.2 Verbrauchsmaterial 22

2.3 Reagenzien 24

2.3.1 Antikörper 24

2.3.2 Chemikalien 26

2.3.3 *Toll-like-Receptor* Liganden 28

2.3.4 Kits 28

2.3.5 Medien	29
2.3.6 Zytokine.....	30
2.3.7 Puffer.....	30
3 Methoden	33
3.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut.....	33
3.2 Zellzählung.....	33
3.3 <i>Ex-vivo</i> Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten.....	34
3.4 <i>Ex-vivo</i> Generierung von dendritischen Zellen aus CD 34-positiven Progenitoren.....	35
3.5 Isolation verschiedener Leukozytensubpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)	36
3.6 Durchflusszytometrie.....	36
3.7 Isolation von RNA.....	37
3.8 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	38
3.9 Reverse Transkriptase–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38
3.9.1 cDNA-Synthese.....	39
3.9.2 PCR-Durchführung.....	40
3.10 Agarosegelelektrophorese.....	41
3.11 Zelllyse	42
3.12 Proteinkonzentrationsbestimmung	43
3.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.14 Western Blot.....	45
4 Ergebnisse.....	48
4.1 Nachweis der differentiellen Expression des Gens p275 in Monozyten und dendritischen Zellen	48
4.1.1 Phänotyp der verwendeten DC	48
4.1.2 Nachweis der Aktivierung des Gens p275 in DC mit RT-PCR	49
4.2 Nachweis der Spezifität des verwendeten Antikörpers für das Protein P275.....	50
4.3 Nachweis der Expression des Proteins P275 in DC.....	51
4.4 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der Expression von P275 in der Entwicklung von DC	52

4.4.1	Charakterisierung des Verlaufs der Transkription des Gens p275 durch RT-PCR	53
4.4.2	Charakterisierung des Verlaufs der Expression von P275 durch Western Blot	54
4.5	Einfluss von Stimuli auf die Expression von P275.....	55
4.6	Einfluss von Inhibitoren der DC-Entwicklung auf die Expression von P275.....	57
4.7	Expression von P275 in verschiedenen Leukozyten Subpopulationen .	58
4.7.1	Phänotypisierung von Monozyten, Lymphozyten und verschiedenen Subpopulationen dendritischer Zellen	58
4.7.1.1	Monozyten	58
4.7.1.2	B- und T-Lymphozyten	60
4.7.1.3	DC aus CD34-positiven Stammzellen	62
4.7.1.4	Plasmazytoide DC, DC aus dem Blut und CD1c-positive DC....	63
4.7.2	Expression des Gens p275 in verschiedenen Leukozyten Subpopulationen	66
4.7.3	Expression des Proteins P275 in verschiedenen Leukozyten Subpopulationen	67
5.	Diskussion	69
5.1	Spezifität des eingesetzten Antikörpers für P275	69
5.2	Differentielle Expression von P275 in DC, den verschiedenen DC Subpopulationen und Lymphozyten	70
5.3	Zeitlicher Verlauf der Expression von P275 bei der Entwicklung der DC aus Monozyten.....	72
5.4	Einfluss der Stimulation von DC bzw. der Inhibition der DC-Entwicklung auf die Expression von P275.....	72
6	Zusammenfassung.....	75
	Abkürzungsverzeichnis	76
	Abbildungsverzeichnis	80
	Tabellenverzeichnis	82
	Literaturverzeichnis	83
	Danksagung.....	92

Lebenslauf 93

Beitrag zu einer wissenschaftlichen Fachtagung:

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie vom 04.11. – 08.11.2006 in Leipzig im Rahmen des Vortrags:

„Characterization of dendritic cell-specific genes p275 and p306

Hilgendorf I.*, Kurz D.*, Bringmann A., Grünebach F., Kanz L., Brossart P.“
vorgestellt.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist ständig der Gefahr ausgesetzt, von fremden Organismen besiedelt zu werden, die im Körper ideale Wachstumsbedingungen vorfinden. Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, das Eindringen der fremden Organismen zu verhindern bzw. sie aufzufinden und abzutöten. Es ist auch seine Aufgabe, fremde Schadstoffe zu inaktivieren und aus dem Körper zu entfernen. Ferner dient die Immunabwehr der Überwachung körpereigener Zellen. Sie ist für die Abtötung entarteter Zellen und die Entfernung von unnutzem und schädlichem körpereigenen Material verantwortlich. Die Immunabwehr setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: Dem unspezifischen angeborenen Immunsystem und dem spezifischen erworbenen Immunsystem.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene unspezifische Immunsystem schützt den Körper in der Initialphase vor Pathogenen bzw. dämmt sie solange ein, bis das erworbene spezifische Immunsystem seine volle Wirkung entfalten kann. Es setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Zu diesen zählt als erstes die Barrierefunktion der Epithelien, die verhindert, dass sich eine Infektion überhaupt erst im Körper etabliert. Als nächstes sind Moleküle und Zellen an der Reihe, um die Krankheitserreger zu zerstören, wenn sie die erste Barriere durchbrochen haben. Hierbei spielen die Gewebsmakrophagen, Granulozyten und NK-Zellen als Komponenten der zellulären und die Akute Phase Proteine sowie der alternative Weg des Komplementsystems als Komponente der humoralen Immunität die Hauptrolle. Des Weiteren sind Zytokine und Chemokine ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort. Sie führen zu lokalen und systemischen Gefäß- und Gewebereaktionen, induzieren Chemotaxis zum Entzündungsherd hin und stehen an der Schnittstelle zum erworbenen Immunsystem. Sobald das angeborene Immunsystem die eingedrungenen Krankheitserreger erkannt hat, werden diese durch verschiedene Mechanismen

vernichtet. Das unspezifische Immunsystem erkennt die Pathogene nach einem System der Mustererkennung, d.h. nach Bestandteilen, die auf vielen Mikroorganismen vorhanden sind, wie z.B das LPS in der Wand gramnegativer Bakterien. Es besitzt keine Gedächtnisfunktion, die Immunantwort wird somit bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen nicht verstärkt. Gelingt die Vernichtung des Erregers nicht, bereitet das unspezifische Immunsystem den Boden für den Angriff des erworbenen adaptiven Immunsystems. [Janeway et al., 2002]

1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene adaptive Immunsystem ist ein hochspezifisches Abwehrsystem, das auf den zu bekämpfenden Krankheitserreger ausgelegt ist. Es basiert auf der klonalen Selektion von Lymphozyten aus einem großen Repertoire von Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität. Dadurch ist es dem Immunsystem möglich, jedes beliebige Antigen zu erkennen. Ist das Antigen erkannt, werden durch die klonale Expansion eine Vielzahl von spezifischen Effektorzellen gebildet. Dies sind zum einen Plasmazellen, die sich aus B-Zellen entwickeln und durch die Produktion von Antikörpern den humoralen Anteil des spezifischen Immunsystems darstellen, zum anderen spezifische T-Lymphozyten, die für die zelluläre Bekämpfung der Krankheitserreger verantwortlich sind. Neben den Effektorzellen entsteht durch die klonale Selektion auch eine erhöhte Zahl von Gedächtniszellen, die eine schnellere und effizientere Abwehr des selben Erregers bei einer erneuten Infektion zu einem späteren Zeitpunkt ermöglichen. Darauf basiert unter anderem das Prinzip der Schutzimpfung. [Janeway et al.,2002]

1.2 Zellen des Immunsystems

Neben den Erythrozyten und Thrombozyten stammen auch alle Zellen des Immunsystems von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese Stammzellen entwickeln sich zunächst zu den lymphoiden Vorläuferzellen, aus denen sich später die B- und T-Lymphozyten entwickeln,

sowie den myeloiden Stammzellen, aus denen die restlichen Leukozyten hervorgehen. Zu den Abkömmlingen der myeloiden Vorläuferzellen zählen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen und unreife dendritische Zellen.

Die Granulozyten lassen sich auf Grund ihres Färbeverhaltens in neutrophile, eosinophile und basophile Zellen unterteilen. Die neutrophilen Granulozyten sind neben Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen die dritte phagozytische Zellart. Sie stellen den wichtigsten Teil der zellulären Abwehr des angeborenen Immunsystems dar [Edwards, 1994]. Die eosinophilen Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten und bei allergischen Erkrankungen [McEwen, 1992, Spry 1986]. Über die Funktion der basophilen Zellen ist noch recht wenig bekannt, sie wirken wahrscheinlich ähnlich den eosinophilen Zellen und Mastzellen [Janeway et al., 2002].

Die Vorläufer der Mastzellen im Blut sind nicht genau bekannt. Sie differenzieren im Gewebe und beeinflussen die Gefäßpermeabilität. Mastzellen sind wie eosinophile Granulozyten an allergischen Reaktionen beteiligt und schützen die Schleimhäute vor Krankheitserregern [Janeway et al., 2002].

Auf die Aufgaben und Funktion von dendritischen Zellen, Monozyten und Lymphozyten wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

1.2.1 Dendritische Zellen (DC)

Bereits 1868 waren dendritische Zellen von Paul Langerhans in der Haut entdeckt und als Langerhans Zellen bezeichnet worden [Langerhans, 1868]. Sie wurden zu diesem Zeitpunkt jedoch noch dem Nervensystem und nicht dem Immunsystem zugeordnet. Dendritische Zellen in ihrer heutigen Funktion und Bedeutung wurden erstmals 1973 von Steinmann und Cohn beschrieben [Steinmann et Cohn, 1973]. Ihren Namen erhielten sie auf Grund ihres außergewöhnlichen morphologischen Erscheinungsbildes, ihren baumartigen Zytoplasmafortsätzen (griechisch: dendros = Baum).

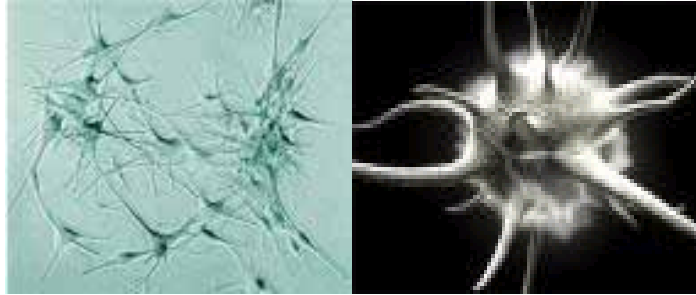


Abbildung 1.1: Darstellung dendritischer Zellen. Links eine lichtmikroskopische Aufnahme [www.igb.fraunhofer.de], rechtes Bild aus www.nature.com.

Sie zählen neben Makrophagen und B-Lymphozyten zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems und nehmen eine zentrale Rolle in der Aktivierung von spezifischen Immunantworten ein [Banchereau et al., 1998]. Als stärkster Stimulator naiver T-Zellen sind sie in der Lage, diese ohne die Hilfe weiterer Zellen zu aktivieren und so eine klonale Expansion auszulösen [Steinman et al., 1991]. Unreife DC findet man unter den meisten Körperoberflächen (Epithelien) und in allen inneren Organen, um dort über rezeptorvermittelte Endozytose, Phagozytose sowie unspezifische Makropinozytose Antigene aufzunehmen. Nach Aktivierung durch Zytokine und TLR-Liganden wandern sie in die regionären Lymphknoten und präsentieren die aufgenommenen Antigene den T-Lymphozyten. Während der Wanderung reifen die DC aus, d.h. sie exprimieren eine grosse Zahl von MHC I - und MHC II - Molekülen, costimulatorischen B7-Molekülen sowie die Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD11a (LFA-1), CD58 (LFA-3) und CD209 (DC-SIGN), die für die Interaktion mit den T-Lymphozyten benötigt werden. Auf der anderen Seite verlieren sie die Fähigkeit, weitere Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Durch die Sekretion des Chemokins DC-CK, das nur von DC in lymphatischem Gewebe ausgeschüttet wird, werden gezielt naive T-Zellen angelockt.

DC spielen auch für die Immuntoleranz gegen Selbstantigene eine wichtige Rolle [Matzinger et al., 1989]. Wurden sie nicht durch eine Infektion aktiviert, wandern sie nach Ablauf ihrer Lebenszeit ebenfalls in die Lymphknoten und präsentieren dort körpereigene Antigene. Da sie nicht die richtigen costimulatorischen Moleküle exprimieren, lösen sie eine Toleranz gegen die präsentierten Autoantigene aus. [Janeway et al., 2002]

1.2.1.1 Subtypen dendritischer Zellen

Bei den dendritischen Zellen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, die in weitere Untergruppen unterteilt werden kann. Sie unterscheiden sich in ihrer Lokalisation, ihren Oberflächenmarkern und ihrer Funktion. Zur Zeit geht man von 3 verschiedenen Subtypen von DC aus, die sich alle aus den hämatopoetischen Stammzellen (CD34⁺) entwickeln [Shortman et al., 2002, Lipscomb et al., 2002, Hart, 1997]. Die DC wandern über das Blut (DC aus dem peripheren Blut) in die verschiedenen Gewebe und Organe ein und differenzieren dort z.B. zu den Langerhans Zellen (LC) der Haut und den interstitiellen DC. Eine weitere Untergruppe, die plasmazytoiden DC, sind vorwiegend im lymphatischen Gewebe lokalisiert. Dort warten sie auf den Kontakt mit Antigenen, um anschließend eine Immunantwort zu initiieren (siehe 1.2.1).

Die DC aus dem Blut befinden sich in den peripheren Blutgefäßen oder den afferenten Lymphgefäßen, wobei sie ca. 1% der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) stellen [Knight et al., 1982, Spry et al., 1980].

Die Langerhans Zellen befinden sich in der Epidermis der Haut und sind die einzigen DC, die im unreifen Zustand die charakteristische Birbeck Granula aufweisen [Larsen et al., 1990]. Die Funktion der Birbeck Granula ist unklar, es wird vermutet, dass sie am Antigentransport in die Zelle beteiligt ist oder sekretorische Funktion haben. Nach der Reifung verlieren die Langerhans Zellen die Granula.

Die interstitiellen DC kommen fast allen Organen vor (Herz, Leber, Niere, Pankreas, Darm, Haut, Urogenitaltrakt, Schilddrüse) [Hart et al., 1981, Prickett et al., 1988]. Sie weisen große Ähnlichkeit zu den in vitro aus Monozyten generierten DC auf [Keller, 2001].

Plasmazytoide DC findet man vorwiegend in der T-Zellzone der lymphatischen Organe, sie sind in der Lage, große Mengen an IFN- α auszuschütten, daher wird ihnen eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Viren zugeschrieben [Cella et al., 1999, Siegal et al., 1999].

Die Einteilung der DC in die einzelnen Subpopulationen ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

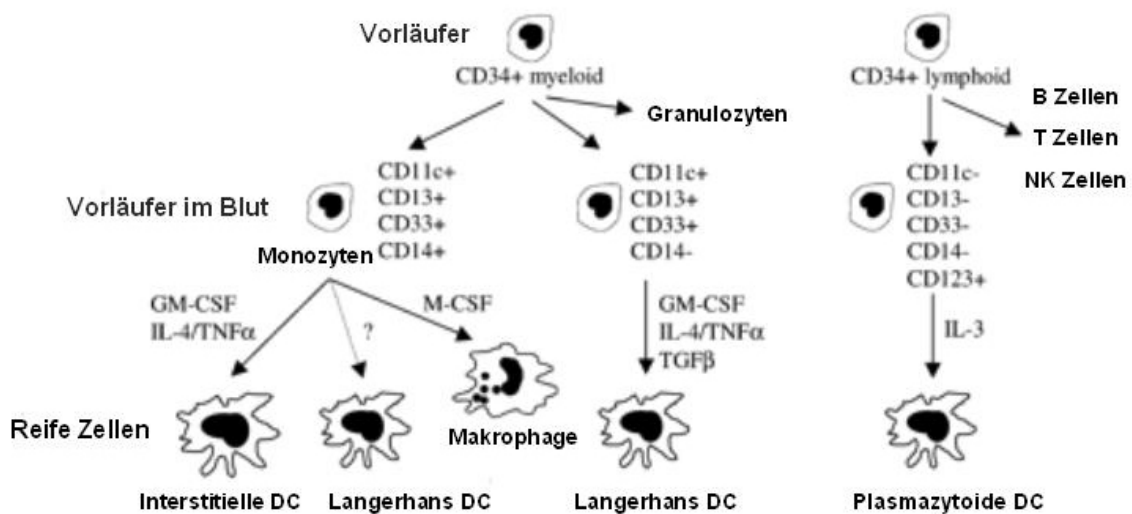


Abbildung 1.2: Darstellung der verschiedenen DC Subtypen und ihrer Oberflächenmarker. [Modifiziert nach Lipscomb et al., 2002].

Die funktionelle Plastizität der DC, je nachdem welchen Zytokinen oder Pathogenen sie ausgesetzt werden, macht es schwierig, den einzelnen DC-Subpopulationen eine genau definierte Funktion zuzuordnen, da sich die Genexpressionsmuster je nach Exposition stark verändern [Shortman et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich aus Monozyten generierte DC nach der Methode von Sallusto und Lanzavecchia verwendet [Sallusto et al., 1994]. Sie sind den interstitiellen DC sehr ähnlich mit dem einzigen Unterschied, dass die in vitro generierten DC eine starke Expression des Oberflächenmoleküls CD1a aufweisen. Interstitielle DC hingegen exprimieren kein CD1a [Pickl et al., 1996]. Des Weiteren wurden DC direkt aus CD34-positiven Stammzellen generiert [Saraya et al., 1996, Ye et al., 1996]. DC aus dem Blut, plasmazytoide DC und CD1c-positiven DC wurden mit magnetischer Zellsortierung direkt aus dem peripheren Blut isoliert und für Versuche verwendet (siehe Methoden 3.5). CD1c-positive DC entsprechen dabei epidermalen LC [Elder et al., 1993, Peiser et al., 2003]. BDCA 2 bzw. BDCA 4 sind für plasmazytoide DC spezifische Oberflächenmarker [Dzionek et al., 2000, Dzionek et al. 2001, Arpinati et al. 2002].

1.2.2 Monozyten

Monozyten stellen die Vorläuferzellen der Gewebsmakrophagen im Blut dar. Sie machen dabei 4–10% der Gesamtleukozyten aus. Nach der Ausschwemmung aus dem blutbildenden Knochenmark zirkulieren sie für etwa zwei bis drei Tage im Blutkreislauf, verlassen anschließend die Gefäßbahn und wandern in die verschiedensten Gewebe ein [Mazarella, 1998]. Die Migration und die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen steht unter dem Einfluss verschiedener Zytokine und Chemokine. So ist z.B. TNF- α für die Chemotaxis zum Ort des Entzündungsgeschehen wichtig. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) ist für die Differenzierung zu Makrophagen entscheidend, wobei eine zusätzliche Stimulation durch Interleukin 4 (IL-4), durch T-Helferzellen sezerniert, eine Entwicklung zu Makrophagen verhindert und statt dessen eine Differenzierung hin zu dendritischen Zellen einleitet [Janeway et al., 2002].

Beispiele für verschiedene ortsständige Gewebemakrophagen sind Alveolarmakrophagen in der Lunge, Kupfer Sternzellen in der Leber, Histiocyten im Bindegewebe und Mikroglia im Gehirn [Goldsby et al., 2001]. Das CD14 Oberflächenmolekül ist spezifisch für Monozyten und Makrophagen und stellt einen Rezeptor für bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien dar. Durch dieses und weitere Rezeptormoleküle sind Monozyten und Makrophagen in besonderem Maße zur Phagozytose befähigt. Nach der Aufnahme der Erreger in endozytotische Vesikel, fusionieren diese mit Lysosomen und der Inhalt wird durch verschiedene Enzyme nach Ansäuerung durch Protonenpumpen abgebaut. Des Weiteren bilden Monozyten und Makrophagen eine Reihe von Mediatoren der Immunabwehr (Leukotriene, Interleukin 1, Interferon) und greifen so regulierend in die weiteren Immunprozesse ein [Lang, 2000].

1.2.3 Lymphozyten

Es existieren zwei verschiedene Typen von Lymphozyten: B-Lymphozyten, die sich nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren und T-Lymphozyten,

die sich zum einen zu zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) und zum anderen zu T-Helferzellen ($CD4^+$) entwickeln.

1.2.3.1 B-Lymphozyten

B-Zellen ($CD19^+$, $CD20^+$) zählen zu den APC und stellen den humoralen Anteil des adaptiven Immunsystems, d.h. sie differenzieren sich nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen und produzieren gegen das Antigen spezifische Antikörper. Über den sogenannten B-Zellrezeptor (BCR) sind sie in der Lage, das für sie spezifische Antigen zu erkennen. Es handelt sich dabei um ein membranständiges Immunglobulin, das zum einen Aktivierungssignale ins Zellinnere sendet, zum anderen das Antigen einschleust und so eine Präsentation auf einem MHC II-Molekül ermöglicht [Lanzavecchia, 1990]. Antigen-spezifische T-Helferzellen (T_H2) erkennen den MHC II:Fremdpeptid-Komplex und regen die entsprechende B-Zelle zur Proliferation, klonalen Expansion und Antikörperproduktion an [Parker, 1990]. Einige mikrobielle Antigene sind in der Lage B-Zellen ohne eine Kostimulation durch T-Helferzellen zu aktivieren.

Bei der Aktivierung und dem Isotypenwechsel der Antikörper spielen verschiedene von den T-Helferzellen sezernierte Zytokine eine Rolle. Besonders wichtig ist der CD40-Ligand ($CD40L = CD154$) aber auch IL-4, IL-5 und IL-6 sind von Bedeutung [Lane, 1992, Valle, 1989, Croft, 1991, Stavnezer, 1996].

Neben der Differenzierung zu antikörperbildenden Plasmazellen entwickelt sich ein Teil der aktivierten B-Zellen zu B-Gedächtniszellen. Sie bilden ein immunologisches Gedächtnis, indem sie sich nur langsam teilen, jahrelang überleben und bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere und stärkere Reaktion hervorrufen [Coico, 1983].

Die von den Plasmazellen gebildeten Antikörper gehören verschiedenen Subklassen an (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD), die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion und an unterschiedlichen Orten des Körpers wirken. IgM-Antikörper finden sich vor allem im Blut, sie sind als Pentamer organisiert und darauf spezialisiert, das Komplementsystem zu aktivieren. IgG-Antikörper

kommen sowohl im Blut als auch in extrazellulären Flüssigkeiten vor, besitzen in der Regel eine höhere Affinität und sind in der Lage, Bakterien, Viren und Toxine zu neutralisieren, für die Phagozytose zu opsonieren und das Komplementsystem zu aktivieren. Für den Schutz der Epithelien sind vor allem die IgA-Antikörper zuständig. Die meisten IgE-Antikörper sind an die Oberfläche von Mastzellen gebunden und lösen damit vor allem lokale Abwehrmechanismen aus. [Janeway, 2002, Janeway, 1967, Clark MR, 1997, Ward ES, 1995]

1.2.3.2 T-Lymphozyten

T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunreaktion des adaptiven Immunsystems verantwortlich. Jede kernhaltige Zelle im menschlichen Körper exprimiert MHC I-Moleküle. Auf diesen Molekülen präsentiert sie im Normalfall zelleigene Peptidfragmente. Wird die Zelle durch einen Virus befallen, kommt es durch die Virusreplikation zur Präsentation eines körperfremden Antigens auf dem MHC I-Molekül. Die CD8-zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, diese fremden Peptide zu erkennen und die Zelle daraufhin abzutöten.

MHC-Moleküle der Klasse II werden hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert und dienen der Präsentation von körperfremden extern aufgenommenen Antigenen. Nun sind es die CD4-T-Helferzellen, die in der Lage sind die darauf gezeigten Antigene zu erkennen. Es existieren dabei zwei Untergruppen: Die sogenannten T_H1-Zellen, die durch die Aktivierung von Makrophagen diese unterstützen, intrazelluläre Bakterieninfektionen zu bekämpfen, indem sie eine Fusion der Lysosomen mit den erregerhaltigen intrazellulären Vesikeln induzieren. Die zweite Gruppe, die T_H2-Zellen, sind ein wichtiger Kostimulator für naive B-Zellen, um diese zur Differenzierung und Proliferation zu Plasmazellen und somit zur Antikörperproduktion anzuregen. [Janeway et al, 2002; Delves et al. 2000]

Beiden T-Zell Untergruppen ist der T-Zellrezeptor (TCR = CD3) gemein. Es handelt sich dabei um einen membranständigen Rezeptor der in seiner Hauptform (α : β -TCR) nur in der Lage ist, an MHC-Moleküle gebundene Peptidfragmente fremder Proteine zu erkennen. Jede T-Zelle trägt ein TCR

unterschiedlicher Spezifität. Der TCR ist hochvariabel, so dass praktisch jedes Antigen von einer der T-Zellen erkannt werden kann, diese dann entsprechend klonal expandieren und ihre Funktion wahrnehmen kann [Delves et al. 2000].

Bei der Interaktion des TCR einer T-Zelle mit dem MHC-Molekül einer DC spielen neben dem CD8- bzw. dem CD4-Molekül weitere kostimulatorische Moleküle eine Rolle. So ist für die klonale Expansion der naiven T-Zelle ein zweites, B7-vermitteltes Signal nötig, das über CD28 auf der T-Zelle die Synthese von IL-2 und dessen Rezeptor in der T-Zelle einleitet [Lanzavecchia et al., 1993; Larsen et al., 1992 ; Young et al., 1992]. Über einen autokrinen Mechanismus induziert IL-2 die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen [Fraser et al., 1991].

Durch die Bindung des CD40 Rezeptors der APC an seinen Liganden Protein p39 (CD40L) auf der T-Zelle wird eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) erreicht [Caux et al., 1994; Cayabyab et al., 1994; McLellan et al., 1996]. Bleiben die kostimulatorischen Signale der APC aus, so kommt es zur Anergie der T-Zelle, sie können nicht weiter auf das Antigen reagieren und bleiben ohne Funktion [Schwartz et al., 1990]. Dies zeigt, wie wichtig die kostimulatorischen Moleküle für erfolgreiche T-Zellaktivierung sind.

Auch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie TGF- β oder IL-10 behindern eine normale Aktivierung der T-Lymphozyten und somit ihre klonale Expansion.

1.3 Zytokine und Chemokine

Bei Zytokinen handelt es sich um kleine Proteine (MG ~25kDa), die für die Regulation der Immunantwort von wichtiger Bedeutung sind. Sie können autokrin, d.h. auf die sezernierende Zelle selbst, parakrin in der unmittelbaren Zellumgebung und endokrin, d.h. im gesamten Körper wirken.

Es gibt 3 strukturelle Hauptfamilien: die Hämatoopoetin-Familie, zu denen die Wachstumshormone sowie zahlreiche Interleukine zählen, die TNF-Familie, die für die unspezifische und spezifische Immunantwort von Bedeutung ist und die Chemokin-Familie.

Als Chemokine wird eine Gruppe von Zytokinen bezeichnet, die zur Aufgabe hat, Zellen mit einem entsprechenden Rezeptor zur Quelle der Chemokine zu locken und somit für die Rekrutierung von Abwehrzellen zu sorgen [Larsson et al., 1999, Svanborg et al., 1999, Scapini et al., 2000].

Tabelle 1.1: Auswahl verschiedener Zytokine, der produzierenden Zellen und ihrer Wirkung; IL=Interleukin, TNF=Tumornekrosefaktor, IFN=Interferon [nach Janeway et al., 2002]

Zytokin	Produzierende Zelle	Wirkung
IL-1	Makrophagen	Fieber, T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-2	T-Zellen	Proliferation der T-Zellen
IL-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, IgE-Wechsel, hemmt T _H 1-Zellen
IL-10	T-Zellen, Makrophagen	Inhibitor von DC- und Makrophagenfunktion
TNF- α	Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen	Lokale Entzündung, Endothelaktivierung
IFN- α	Leukozyten	Antiviral, erhöht MHC I Expression
IFN- γ	T-Zellen, NK-Zellen	Aktiviert Makrophagen, erhöht MHC Expression, IgG-Wechsel, hemmt TH ₂ -Zellen
GM-CSF	Makrophagen, T-Zellen	Stimuliert Wachstum und Differenzierung der monomyeloischen Reihe, v.a. der DC

1.4 Proteinbiosynthese

Der Bauplan für sämtliche Proteine einer Zelle ist in der DNA enthalten. Diese befindet sich im Zellkern, muss abgelesen werden, und die Information muss anschließend zum Proteinsyntheseapparat, den Ribosomen, im Zytosol gelangen. Zunächst wird das Gen von dem DNA-Doppelstrang enzymatisch in eine komplementäre einsträngige hnRNA (heteronukleäre RNA) umgeschrieben (Transkription) [Brenner et al., 1960; Crick, 1970; Jacob et Monod, 1961]. Jedes Gen enthält neben den codierenden (Exons) auch nicht codierende Abschnitte

(Introns). Die Introns werden bei dem Vorgang des Spleißens aus der hnRNA entfernt und die Enden modifiziert (5' Cap-Struktur und 3' Polyadenylierung) [Banerjee, 1980; Birnstiel et al., 1985, Darnell, 1983, Humphrey et Proudfoot, 1988, Sharp, 1987]. Bei der Exzision der Introns spielt die sogenannte „small nuclear RNA“ (snRNA) eine wichtige Rolle [Guthrie et Patterson, 1988, Maniatis et Reed, 1987]. Der verbleibende RNA-Einzelstrang ist in seiner gesamten Länge codierend und wird nun mRNA (*messenger RNA*) genannt. Die mRNA verlässt den Kern und wandert ins Zytosol. Es erfolgt nun die Übersetzung der Basenfolge in die Aminosäurefolge des zu synthetisierenden Proteins (Translation). Für jede der 20 proteinogenen Aminosäuren existiert eine spezifische tRNA (*transfer RNA*). Die mit der Aminosäure beladene tRNA erkennt mit ihrem Antikodon das komplementäre Kodon auf der sich an den Ribosomen befindenden mRNA. Die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren erfolgt über eine Peptidyltransferaseaktivität des Ribosoms. Auf diese Weise wird die Übersetzung der Nukleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine gewährleistet. [Crick, 1966, Nirenberg et Leder, 1964, Schimmel, 1987].

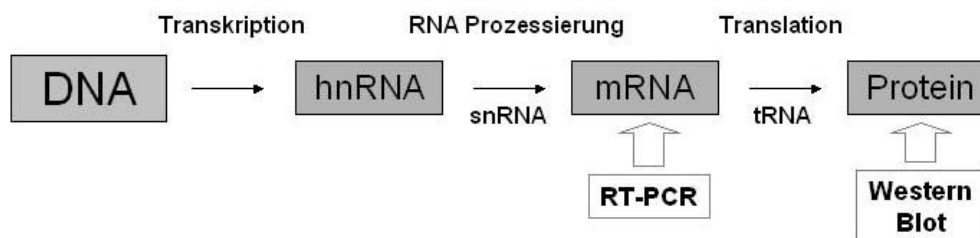


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese. In den grau-umrandeten Feldern sind die möglichen Nachweismethoden für mRNA → RT-PCR und für Protein → Western Blot genannt.

1.5 Membranständige Transportproteine

Transportproteine sind die Pfortner der Zelle. Sie regulieren die Aufnahme und die Abgabe von lebenswichtigen Verbindungen wie Zuckern, Aminosäuren, Nukleotiden, anorganischen Ionen und Medikamenten. Man kann sie in aktive

und passive Transporter einteilen. Passive Transporter ermöglichen den Transport gelöster Substanzen entlang des elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran. Die aktiven Transporter hingegen schaffen, unter dem Verbrauch von Energie, einen elektrochemischen Gradienten für Ionen/gelöste Stoffe über die Zellmembran. Sie lassen sich weiter in primär- und sekundär-aktive Transporter unterteilen. Primär-aktive Transporter befördern Ionen, Kohlenhydrate, Lipide, *Xenobiotics* und Medikamente in und aus der Zelle oder den Zellkompartimenten, unter dem direkten Verbrauch von ATP als Energielieferant [Borst, 2002]. Durch die Verschiebung von Ionen (Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+}) durch die Ionenpumpen entstehen elektrochemische Gradienten und werden Aufrecht gehalten [Dunbar et al., 2000, Muller et al., 2003]. Diese elektrochemischen Gradienten werden von sekundär-aktiven ionengekoppelten Transporten dazu genutzt, ihrerseits Stoffe über die biologische Membran zu transportieren.

Ähnlich hierzu erlauben Kanäle in der Zellmembran eine Bewegung von Ionen und gelösten Stoffen über Membranen entlang des elektrochemischen Gradienten [Armstrong, 2003, DeCoursey, 2003, Jiang et al., 2003, Yu et al., 2003]. Transporter haben typischerweise eine festgelegte Stöchiometrie von Ionen/gelösten Stoffen pro Translokationszyklus, der Fluss von Ionen/gelösten Stoffen durch Kanäle auf der anderen Seite ist abhängig von der Öffnungswahrscheinlichkeit, „*Gating*“-Mechanismen und Leitfähigkeitsverhältnissen.

1.5.1 Transportproteine der SLC (solute carrier) - Familien

Die SLC-Transporterserie (*solute carrier*) schließt Gene ein, die für passive und ionengekoppelte Transport- und Austauschproteine kodieren. Sie beinhaltet zur Zeit 298 Transportproteine in 43 Familien und es kommen laufend neue hinzu. (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/, www.pharmaconference.org/slctable.asp). Damit stellen die SLC Gene einen beträchtlichen Anteil an der Gesamtheit der Transportergene, die insgesamt ungefähr 5% (> 2000) aller menschlichen Gene ausmachen. Zu den übrigen „nicht SLC“-Transportern gehören ATP-getriebene Transporter, Kanäle, ionotrope Rezeptoren, Aquaporine, Transporter- und

Kanal Untereinheiten, Hilfs- und Regulationstransportproteine [Hediger et al., 2003].

1.6 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels cDNA

Subtraktion

Mit der Methode der subtraktiven cDNA Hybridisierung ist es möglich, zwei mRNA Populationen, d.h. z.B. die mRNA von Monozyten und DC zu vergleichen und die Gene herauszufiltern, die nur in einem der beiden Zelltypen exprimiert werden. Zuerst werden beide mRNA Populationen in cDNA konvertiert, dabei wird die cDNA mit spezifischen differentiell exprimierten Transkripten als *Tester* (DC) und die Referenz-cDNA als *Driver* (Monozyten) bezeichnet. *Tester*- und *Driver*-cDNA werden hybridisiert und die Hybridsequenzen anschließend entfernt. Die somit verbleibenden unhybridisierten cDNA-Sequenzen stellen die in der *Driver*-mRNA differentiell exprimierten Gene dar. Sie werden auch EST (*expressed sequence tag*) genannt. Für die Durchführung dieser Methode existieren mehrere Verfahren [Siebert et al., 1995]. Neben bereits bekannten Genen ist es mit Hilfe von DNA-Gendatenbanken möglich neue Gene zu erkennen. Das Gen AF070578 für das Protein P275, das Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde mit dem cDNA Subtraction Kit „BD PCR-Select™“ der Firma BD Biosciences-Clontech identifiziert [www.clontech.com].

Im Anschluss an die Identifizierung durch cDNA-Subtraktion wurde das Gen AF070578 kloniert und sequenziert.

In Abbildung 1.3 ist die cDNA-Sequenz des Gens AF070578 dargestellt. Datenbankanalysen [BlastN: www.ncbi.nlm.nih.gov, NIX: www.hgmp.mrc.ac.uk] ergaben, dass das Gen auf Chromosom 14 (ab 71008 bp) lokalisiert ist und 18 Exons umfasst. Die Länge der cDNA-Sequenz beträgt 1709 bp, dabei ist das größte offene Leseraster 549 bp lang. Dies entspricht einer Proteingröße von 183 Aminosäuren bzw. ~ 21kDa.

Die *Primer*-Sequenzen für den Nachweis des Gens mit der RT-PCR wurden ebenfalls in Abbildung 1.3 kenntlich gemacht.


```

Cctgccaataagaccagaaaaggaggaccgcaccgggacaggggagatgctggagcctgaaccctgg
gggatggggtctgaaggcagccgagattcagatgagattggcgcagttatgaacgtgatagcagcctagcat
actctagaaagaaaagatgaaaagcgtcgggtggaagagatgcagcgttgagtgaagctgcgaacatgatgg
gatgagcggccctaggattatgtactcactgctgaactcacagacagcgaatcccagggtgttcatttggttatcagt
gttaatttgatgaatgccatcatgggaagtggcatcctggcttagcttatgttatggctaataccgggtgtcttgattta
gcttctgctgctgacagttgctctcctggcttctactcagtcctctctgcttagtatgttattcagacagcctactgg
gccatgaactaactactcatggtctgcctgcacattgactcacctgtctccgltgattgaattcctcaatcttgtaa
aattctctgaggagctgaacatctatgaagatctggactcttgcattggatfacctggaaagttggtggtg
gcaggcaccataataaaltcagaatattggagctatgtcatcttatctttaattataaaacagagcttctgctgctattg
cagaatftttgactggagactatagtagatattggtatcttgatggacaaacactactaataatcatatgttggcattg
gttccctctgcactcttcccaaataggcttctggctacacaagtagttatcattttctttatgatgttcttgctctgt
ggtaataaataaaaaatggtccatccctgtcctctgacattaaattatgtagagaaaggctccagatttcaa
atgttacagatgattgtaagccaaagctcttcttccaaagagagtgcttatgccttccaacctggcttttctt
ctctgccatacctcaatattgccatatactgtgaactcaaagctcttcaagaaaagaatgcagaatgttccaat
acagcaatgtcttaagtttctcattatfttatactgcactcttgggtacctcacttttatgatgaacaactaaagcca
gagaggtgaagtgacctgtcacagaaltaaagacaaagtggagtcagaaltactaaaagggtatagtaataactta
tcacatgatgttgtcatgactgtgaagttatgcatactattgctgtctttgacagtccttctaataccacttccctgcc
agaaaagctgtaacaatgatgttttcccaatttccattctcatggattgccatttttgatcactctagcactcaatatt
atcatcgtttacttgcaatataatgttctgacattagaaatgtattggtgtagttggtgccagtacatcaacatgttgatt
ttatattcccaggactatfttatactaaacttagcagagaggattttctgtcatggaaaaagctggggcattcgtttgctc
atcttggaaatttggtgggaatttagtttagcactcatcattttgattggattaataataaaaagaaatatttctaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Abbildung 1.4: Darstellung der cDNA-Sequenz des Gens AF070578. Die Länge beträgt 1709 bp. Das längste offene Leseraster (schwarze Buchstaben) umfasst 549 bp, dies entspricht 183 Aminosäuren (~21kDa). Die für die RT-PCR verwendeten Primersequenzen sind fett gedruckt und vergrößert dargestellt.

1.7 Das Protein P275

Für die Erstellung der Aminosäuresequenz des Protein P275 wurde der längste offene Leserahmen der cDNA-Sequenz, beginnend mit dem Startcodon (ATG) und endend mit dem Stopcodon (TGA), herausgesucht und die Basenfolge in die entsprechende Aminosäure übersetzt (Abbildung 1.4). Die Aminosäuresequenz lässt auf ein Molekulargewicht des Proteins P275 von ungefähr 21 kDa schließen.

MSSYLLIIKTELPAAIAEFLTGDYSRYWYLDGQTLIIIC
VGIVFPLALLPKIGFLGYTSSLSFFFMMFFALVVIKKW
SIPCPLTLNYVEKGFQISNVTDDCKPKLFHFSKESAYA
LPTMAFSFLCHTSILPIYCELQSPSKKRMQNVTNTAIAL
SFLIYFISALFGY**LTFYDEQLKPREVK**

Abbildung 1.5: Darstellung der Aminosäuresequenz des Proteins P275. Bei der fettgedruckten Sequenz handelt es sich um das für die Antikörperherstellung verwendete Vakzinierungspeptid. (A=Alanin, C=Cystein, D=Aspartat, E=Glutamat, F=Phenylalanin, G=Glycin, H=Histidin, I=Isoleucin, K=Lysin, L=Leucin, M=Methionin, N=Asparagin, P=Prolin, Q=Glutamin, R=Arginin, S=Serin, T=Threonin, V=Valin, W=Tryptophan, Y=Thyrosin)

Mit Hilfe von Vorhersageprogrammen [www.expasy.org, www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0] wurde eine Vorhersage für eine hypothetische Struktur des Proteins P275 erstellt (Abbildung 1.5). Es handelt sich um ein Transmembranprotein mit 3 extrazellulären, 2 intrazellulären und 3 transmembranösen Anteilen.

Weitere Datenbankanalysen [www.ncbi.nlm.nih.gov] zeigten eine große Ähnlichkeit mit dem N-System Aminosäuretransporter NAT-1 (SNAT-6, Genbezeichnung SLC38A6, Molekulargewicht: ~51 kDa). Es handelt sich bei P275 wahrscheinlich um eine Spleißvariante des NAT-1 Transporters, da die Aminosäuresequenz von P275 zu über 95% ein der Aminosäuresequenz von NAT-1 entspricht (siehe Abbildung 1.6).

```

MEASWGSFNAERGWYVSVQQPEEAEEELSPLLSNELHR
QRSPGVSFGLSVFNLNMAIMGSGILGLAYVMANTGVFGFSF
LLLTVALLASYSVHLLLSMCIQTAVTSYEDLGLFAFGLPGKL
VVAGTIIIQNIAMSSYLLIIKTELPAAIAEFLTGDYSRYWYLD
GQTLIIICVGIVFPLALLPKIGFLGYTSSLSFFFMMFFALVVII
KKWSIPCPLTLNYVEKGFQISNVTDDCKPKLFHFSKESAYAL
PTMAFSFLCHTSILPIYCELOSPSKKRMQNVNTAIALSFLIY
FISALFGYLTFYDKVESELLKGYSKYLSHDVVMTVKLCILFA
VLLTVPLIHFPARKAVTMMFFSNFPFSWIRHFLITLALNIIIVLL
AIYVPDIRNVFGVVGASTSTCLIFIFPGLFYLKLSREDFLSWK
KLGAFVLLIFGILVGNFSLALIIFDWINK
    
```

Abbildung 1.6: Vergleich der Aminosäuresequenz des N-System Aminosäuretransporters NAT-1 und des Proteins P275. Rot dargestellt ist die Aminosäuresequenz von NAT-1, schwarz die von P275. Bei der fettgedruckten Sequenz handelt es sich um den Anteil, der in dem für die Antikörperherstellung verwendete Vakzinierungspeptid enthalten ist. (A=Alanin, C=Cystein, D=Aspartat, E=Glutamat, F=Phenylalanin, G=Glycin, H=Histidin, I=Isoleucin, K=Lysin, L=Leucin, M=Methionin, N=Asparagin, P=Prolin, Q=Glutamin, R=Arginin, S=Serin, T=Threonin, V=Valin, W=Tryptophan, Y=Thyrosin)

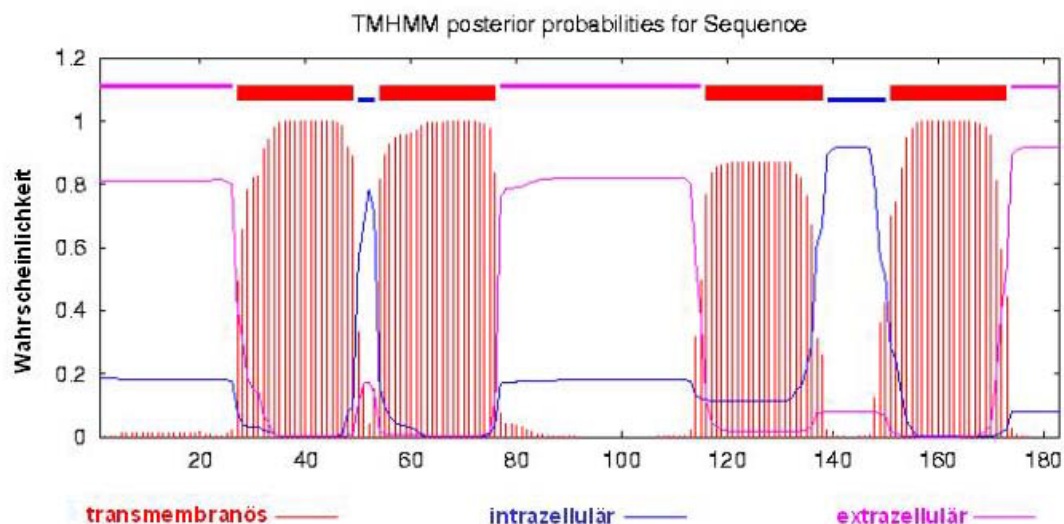


Abbildung 1.7: Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur für P275 [www.expasy.org, www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0]. Rot dargestellt sind die transmembranösen, blau die intrazellulären und violett die extrazellulären Bereiche. Die x-Achse zeigt die Zahl in der Aminosäurefolge, die y-Achse die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer der Bereiche.

1.7.1 Natriumgekoppelter neutraler Aminosäure (System N/A) Transporter der SLC38 Genfamilie

Die natriumgekoppelten neutralen Aminosäuretransporter der SLC38-Familie können in System A und System N Untertypen eingeteilt werden. Die System A Untertypen (SNAT-1, SNAT-2 und SNAT-4) transportieren kleine, aliphatische Aminosäuren und sind pH-sensitiv. Die System N Untertypen Transporter SNAT-3 und SNAT-5 transportieren H⁺-Ionen entgegen den Aminosäuren und besitzen ein engeres Substratprofil als die Untertypen vom System A. Mit Ausnahme von SNAT-4 stellt sich Glutamin als das bevorzugte Substrat der Familie dar. Ohne Zweifel spielen die SLC38 Transporter viele physiologische Rollen unter anderem beim Glutamintransfer von Astrozyten in Neurone im ZNS, bei der Ammoniakentgiftung und Gluconeogenese in der Leber und der renalen Antwort auf eine Azidose. [Mackenzie B et al., 2004]

Bei dem SNAT-6 oder NAT-1 handelt es sich um eine unveröffentlichte Gensequenz (SLC38A6 auf Chromosome 14), das in einer cDNA-Bibliothek des Gehirns identifiziert wurde. ESTs (*Expressed Sequence Tags*) wurden in verschiedenen Geweben nachgewiesen (Plazenta, Milz, Muskel, Gehirn, Lunge). Es wird als *Orphan* (dt. Waise) bezeichnet, da seine funktionellen Eigenschaften noch nicht näher charakterisiert wurden. SNAT-6 teilt zwischen 44 % und 48 % Sequenzübereinstimmung mit den anderen Mitgliedern der SLC38-Familie. [Mackenzie B et al., 2004]

1.8 Antikörperherstellung

Die Antikörperherstellung gegen das Protein P275 wurde von der Firma Pineda Antikörper Service, Berlin vorgenommen. Dabei wurde ein 15 bp langes Immunisierungspeptid mit der Sequenz NH₂-CLTFYDEQLKPREVK-COOH nach zuvoriger Epitopenanalyse verwendet (siehe auch Abbildung 1.4). Der N-terminal hinzugefügte Cysteinrest diente der Koppelung des Peptids an die Proteincarrier für die Immunisierung. Es wurden zwei Kaninchen mit dem sepharosegekoppelten Peptid vakziniert und der polyklonale monospezifische

IgG Antikörper am 145. Immunisierungstag aus dem Antiserum der Tiere gewonnen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Erforschung der dendritischen Zellen und ihre Charakterisierung ist nach wie vor nicht abgeschlossen. Interessant sind dabei vor allem Proteine, die differentiell nur in DC exprimiert werden und in den übrigen Leukozytenpopulationen nicht zu finden sind. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und der subtraktiven DNA-Analyse ist es möglich, verschiedene dieser neuen Proteine zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die differentielle Expression des Protein P275 in DC zu untersuchen. Dabei wird zuerst ein Augenmerk auf die Expression von P275 im Vergleich zu Monozyten, den Vorläuferzellen der DC, gelegt. Die differentielle Expression wird zum einen auf Ebene der mRNA durch die RT-PCR und zum anderen auf Ebene des eigentlichen Proteins mit Western Blot Analyse untersucht. Als weiterer Punkt interessiert der zeitliche Verlauf der Expression während der Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen. Hierfür werden RT-PCR- und Western Blot- Kinetiken mit unterschiedlichen Zeitintervallen durchgeführt.

DC ändern ihre Eigenschaften und Funktionen nach Stimulation mit bestimmten Zytokinen bzw. ihre Entwicklung wird durch die Exposition mit bestimmten Inhibitoren (IL-10, Imatinib, Troglitazone) gehemmt. In wieweit die Expression von P275 von diesen Vorgängen beeinträchtigt wird, ist ebenfalls Gegenstand der Versuche.

Die Expression in den unterschiedlichen Subpopulationen der DC und Lymphozyten ist von zentraler Bedeutung für die Charakterisierung des Proteins. Es geht schlussendlich darum zu zeigen, dass das Protein P275 ein für DC bzw. für bestimmte DC-Subpopulationen spezifisches Protein ist und damit eine bessere Charakterisierung dieses interessanten Zelltyps zu erreichen. Die Möglichkeit, als Marker innerhalb der Leukozyten zu dienen, ist ein weiterer Aspekt, der die Untersuchung differentiell exprimierter Proteine so interessant macht.

Zukünftig kann eine funktionelle Untersuchung von P275 einen weiteren Baustein für das Verständnis von DC und ihrer komplexen Rolle innerhalb des Immunsystems bereitstellen.

2 Material

2.1 Geräte

In Tabelle 2.1 sind alle für die Versuche verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 2.1: Geräte

Produkt	Hersteller
PCR-Gerät: Cycler Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer Life Science, Wellesley, USA
Agarosegel-Dokumentationsgerät: UV-Reader Biometra Bio Doc Analyzer	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer: FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese-Apparaturen:	
• Mini-Protean 3 Electrophoresis System	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
• GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Stromversorgungsgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Heiz- und Magnetrührer: RCT Basic IKA®	VWR International GmbH Bruchsal, Deutschland
Heizblock für 1,5 ml Reaktionsgefäße: Unitek HBS-130	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Schwenktisch: Polymax 1040	Heidolph Instruments
Lichtmikroskop: Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mini Trans Blot Cell	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland

<i>Magnetic cell separators:</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
• MidiMACS	
• VarioMACS	
Neubauer-Zählkammer	Assistent Germany
Photometer:	Amersham Biosciences Europe
RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	GmbH, Freiburg, Deutschland
ELISA-Gerät:	Tecan Deutschland GmbH,
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Crailsheim, Deutschland
Pipetten:	
10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
20 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank:	Kendro Laboratory Products GmbH,
Kendro Lamin Air HLB 2472 GS	Langenselbold, Deutschland
MS2 Minishaker	IKA Works, Inc, Wilmington, NC, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zellkultur-Brutschrank	NuAire, Inc., Plymouth, USA
Zentrifugen:	
• Kendro Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
• Kendro Megafuge 3.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
• Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2.2 sind für die Untersuchungen verwendete Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Pipetten:	
2 ml, Polystyrol, steril, gestopft	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
5 ml, Polystyrol, steril, gestopft	Corning Inc., Corning, New York, USA
10 ml, Polystyrol, steril, gestopft	Corning Inc., Corning, New York, USA
25 ml, Polystyrol, steril, gestopft	Corning Inc., Corning, New York, USA
50 ml, Polystyrol, steril, gestopft	Corning Inc., Corning, New York, USA
Pipettenspitzen ungestopft	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
200 µl	
1000 µl	
Pipettenspitzen gestopft	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
10 µl	
20 µl	
200 µl	
1000 µl	
Polypropylenröhrchen Falcon®, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PP-Test Tube Cellstar®, steril, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® <i>Tissue Culture Flask</i> 0.2 µm <i>Vented Blue Plug Seal Cap</i> , 250 ml, 75 cm ²	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
NUNC Cryo Tube™ Vials 1,0 ml	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Einweg-Pasteurpipetten 3ml	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Microtubes 0,2 ml (PCR-Softstrips)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Cellstar® 96-Loch- Gewebekulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® 6-Loch-Gewebekulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Falcon® Reaktionsgefäß 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Whatman-Papier	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioSciences GmbH, Dassel, Deutschland
Zellschaber: Cell Lifter	Corning Inc., Corning, New York, USA
MACS-Säulen: • MACS Column LS • MACS Column CS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.3 Reagenzien

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

2.3.1 Antikörper

Antikörper wurden in den Western Blot Versuchen, FACS-Analysen und für die magnetische Zellsortierung eingesetzt. In Tabelle 2.3 sind die verwendeten Antikörper im einzelnen aufgeführt.

Tabelle 2.3: Antikörper

Produkt	Hersteller
Kaninchen Anti-p275 Ak (polyklonal)	Pineda-Antikörper Service, Berlin, Deutschland
Ziegen Anti-Kaninchen HRP-konjugiertes IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-Kaninchen GAPDH IgG	HyTest Ltd., Turku, Finland
Ziegen Anti-Maus HRP-konjugiertes IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD1a FITC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Maus Anti-CD3 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD14 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD19 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD20 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD71 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD86 FITC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Maus Anti-HLA-DR FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD1c (BDCA-1) FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus Anti-BDCA2 FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus Anti-Biotin FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus IgG1 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD3 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD11b PE	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Maus Anti-CD14 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD19 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti CD56 PE	BD Biosciences, San Jose, USA

Maus Anti-CD80 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD83 PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Maus Anti-CD88 PE	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Maus Anti-CD123 PE	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Maus Anti-HLA-DR PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-TCR- α/β PE	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Maus IgG1 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Maus Anti-CD 19 PerCP	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-CD3 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.3.2 Chemikalien

Tabelle 2.4: Chemikalien

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Aprotinin (2 mg/ml)	Sigma, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA

DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA 0,5 M	Sigma, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
FCS	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll: Biocoll <i>Separating Solution</i>	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis, USA
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Peptid P275	Pineda-Antikörper Service, Berlin, Deutschland
PMSF	Sigma, St. Louis, USA
<i>Primer für p275 (AF070578)</i>	BioTeZ, Berlin, Deutschland
<i>Primer Sequenzen:</i>	
FP: TACCTGGAAAGTTGGTGGTG	
RP: GTCCATCCCTTGTCCTCTGA	
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Slim Fast Schokolade</i>	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Imatinib	Imatinib wurde der AG Brossart von Elisabeth Buchdunger, Novartis Pharmaceuticals, Basel, Schweiz überlassen
Streptavidin HRP konjugiert	Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

TGZ	Biomol, Hamburg, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
Tween® 20	Sigma, St. Louis, USA
<i>GeneRuler™ 1kb DNA Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
<i>Bench Mark™ Prestained Protein Ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Biotinylated SDS PAGE Standards Low Range</i>	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2.3.3 Toll-like-Receptor Liganden

Tabelle 2.5: *Toll-like-receptor* Liganden

Produkt	Hersteller
Pam ₃ Cys (TLR-2-Ligand)	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Poly I:C (TLR-3-Ligand)	Sigma, St. Louis, USA
LPS (TLR-4-Ligand)	Sigma, St. Louis, USA
R848 (TLR-7-Ligand)	InvivoGen, San Diego, USA

2.3.4 Kits

Tabelle 2.6: Kits

Produkt	Hersteller
<i>MACS Blood Dendritic Cell Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

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

2.3.5 Medien

Tabelle 2.7: Medien

Produkt	Zusammensetzung	Hersteller
RPMI 1640 mit Glutamax-I	Mit L-Glutamin und 25 mM HEPES	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Bio Whittaker™ X-VIVO 20		Cambrex Bio Science, Walkersville, USA
RP10-Nährmedium	Medium RPMI 1640 mit Glutamax-I, 10% hitzeinaktiviertes FCS (45 min bei 55°C), 100 IU/ml Penicillin / Streptomycin	Alle verwendeten Produkte von Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland

2.3.6 Zytokine

Tabelle 2.8: Zytokine

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

2.3.7 Puffer

Tabelle 2.9: Puffer

Produkt	Zusammensetzung
RIPA-Lysepuffer	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS 2 mM EDTA 2 mg/ml Aprotinin 1 mM PMSF in PBS

NP40-Lysepuffer	0,05 M HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 1% Igepal CA-630 2 mM EDTA 10% Glycerin 2 mg/ml Aprotinin 1 mM PMSF
FACS-Puffer	0,5% FCS in PBS
MACS-Puffer	0,5% FCS 2 mM EDTA in PBS
DNA-Probenpuffer für Agarose- gelelektrophorese, 6-fach	0,15% Bromphenolblau 0,15% Xylencyanol 1 mM EDTA pH 8,0 30% Glycerin in H ₂ O
Laufpuffer für SDS-PAGE	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
Transferpuffer für SDS-PAGE	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS 20% Methanol
Probenpuffer für SDS-PAGE, 3-fach	0,18 M Tris-HCl pH 6,8 28% Glycerin 0,001% Bromphenolblau 6% SDS
TBS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl

0,5% TBST	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 0,5% Tween-20
3% TBST	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 3% Tween-20
TAE	40 mM Tris, 13 mM Essigsäure pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

3 Methoden

3.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Für die Isolation mononukleärer Zellen aus dem Blut (PBMC) wurden *buffy coats* von Spendern der Blutspendezentrale in Tübingen verwendet. Hierfür wurde der *buffy coat* im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt. In 50 ml Falcon®-Kunststoffröhrchen wurden anschließend 12 ml Ficolllösung mit jeweils 33 ml des verdünnten *buffy coat* vorsichtig überschichtet. Es wurde dabei auf eine glatte, unzerstörte Trennschicht zwischen den beiden Phasen geachtet. Die Falcon®-Kunststoffröhrchen wurden in der Zentrifuge Megafuge 3.ORS (2000 rpm (800g), RT, Bremsgradient 3) für 18 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation werden die PBMC, welche eine geringere Dichte als die Ficolllösung aufweisen, als dünne Schicht über der Ficollschicht von den restlichen Zellen (Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Zelltrümmer) abgetrennt. Mit der Absauganlage wurde der Plasmaüberstand oberhalb der PBMC-Schicht auf 2-3 cm abgenommen. Die PBMC Zellschicht wurde nun mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen und in ein neues Kunststoffröhrchen überführt. Bei diesem Schritt wurden in der Regel PBMCs aus 3 verschiedenen Falcon®-Kunststoffröhrchen in einem neuen Falcon®-Kunststoffröhrchen vereinigt. Die neuen Falcon®-Kunststoffröhrchen wurden mit PBS auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und im Anschluss in der Zentrifuge Megafuge 1.OR (1500 rpm, RT, mit Bremse) für 4 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Gesamtzahl der Zellen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2 Zellzählung

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 2 μ l der Zellsuspension mit 20 μ l Trypanblau und 178 μ l PBS in einem Eppendorf-Cup gemischt. Dies entspricht einer 1:100 Verdünnung. Das Trypanblau färbt nur beschädigte Zellen an und durchdringt die Zellwand intakter Zellen nicht. Dies lässt eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen zu. Die Auszählung erfolgte in

einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Es wurde dabei die durchschnittliche Zellzahl in den 16-Felder Eckquadraten erfasst.

Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gezählte Zellzahl} \times 10^{4*} \times 10^2 \times \text{Vol. der Zellsuspension [ml]} = \text{Gesamtzellzahl}$$

* Neubauer-Zahl

3.3 *Ex-vivo* Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Dendritische Zellen wurden *ex-vivo* aus Monozyten generiert. Monozyten können dabei entweder über Zelladhärenz oder über magnetische Zellsortierung (siehe 3.4) aus PBMC isoliert werden.

Für die Zelladhärenz wurden zwischen 7×10^7 und 1×10^8 PBMC pro Kulturflasche für 2 h in 10 ml X-VIVO inkubiert ($T=37^\circ\text{C}$, 5,0% CO_2). Die Monozyten haften nach dieser Zeit an der Kunststoffoberfläche der Kulturflaschen. Nach 2 h wurde der Überstand aus den Kulturflaschen abgesaugt und diese zwei bis drei mal mit je 3 ml PBS ausgewaschen. Nun wurden 10 ml Nährlösung (Nährmedium RPMI 1640, 10% FCS, 2% PenStrep) pro Kulturflasche hinzugegeben. Um eine Differenzierung der Monozyten zu dendritischen Zellen zu erreichen, wurden an den Tagen 0, 2, 4 und 6 nach Inkulturnahme der Zellen die Wachstumsfaktoren GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml) zu jeder Kulturflasche hinzugegeben.

In einigen Untersuchungen wurden DC verwendet, die durch verschiedene Substanzen in ihrer Differenzierung stimuliert oder inhibiert wurden (siehe Tabelle 3.1). Diese Substanzen wurden entweder zu Beginn oder 24 h vor dem Ernten zu den Zellen hinzugegeben. Zur Generierung von DC wurden die Zellen für insgesamt 7 Tage kultiviert.

Tabelle 3.1: Stimulatoren und Inhibitoren der DC-Differenzierung, deren Funktion und eingesetzte Konzentration.

Stimulus	Funktion	Konzentration
CD40L,	CD40	0,50 µg/ml,
IFN- γ	Reifungsstimulus	100 U/ml
LPS	TLR4L	1,00 µg/ml
TNF- α	Reifungsstimulus	0,01 µg/ml
IFN- α	Reifungsstimulus	1×10^4 U/ml
Poly I:C	TLR3L	50,00 µg/ml
Pam ₃ Cys	TLR2L	5,00 µg/ml
R848	TLR7L	2 µg/ml
TGZ	PPAR γ -Agonist, Inhibitor der DC- Entwicklung und - Funktion	4,16 µg/ml
IL-10	Inhibitor der DC- Entwicklung	0,01 µg/ml
Imatinib	Inhibitor der DC- Entwicklung	1,77 µg/ml

3.4 Ex-vivo Generierung von dendritischen Zellen aus CD 34-positiven Progenitoren

Neben der Generierung von DC aus Monozyten ist auch eine Generierung aus CD 34⁺-Stammzellen (Progenitoren) möglich. Nach der Isolation der CD 34⁺-Progenitoren wurden 5×10^5 Zellen in 3 ml RP10-Medium aufgenommen und mit den Zytokinen IL-4 (20 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) und FLT3-Ligand (100 ng/ml) für zehn Tage kultiviert. Die genannten Zytokine wurden an den Tagen 2, 4, 6, 8 erneut in den aufgeführten Konzentrationen zu dem Kulturansatz hinzugegeben. Am Tag 10 wurden die generierten DC geerntet und für weitere Versuche verwendet.

3.5 Isolation verschiedener Leukozytensubpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Für die Isolation verschiedener Leukozytensubpopulationen (Monozyten, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, plasmazytoide DC, DC aus peripherem Blut) wurde das magnetische Zellsortierungskit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Bei diesem Prinzip werden an magnetische *Beads* gekoppelte Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmoleküle eingesetzt.

Im Falle einer positiven Zellsortierung richten sich diese magnetischen Antikörper gegen ein für den zu isolierenden Zelltyp spezifisches Oberflächenmolekül (z.B. CD 14, CD 19, CD 3, BDCA 4). Die PBMC werden mit den Antikörpern inkubiert und anschließend über eine metallhaltige Säule, die sich innerhalb eines Magnetfeldes befindet, gegeben. Hierbei bleiben nur die mit den magnetischen Antikörper markierten Zellen in der Säule haften. Nach mehrmaligen Waschvorgängen wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit MACS- Puffer aus der Säule eluiert.

Die zweite Möglichkeit besteht in einer Zellsortierung durch Zelldepletion. In einem ersten Schritt wird durch ein Gemisch aus verschiedenen magnetischen Antikörpern ein Teil der PBMC in der Magnetsäule festgehalten und diese Zellen somit aus dem Zellgemisch entfernt. Der zu isolierende Zelltyp befindet sich in dem Eluat und wird in einem zweiten Schritt über eine weitere Säule durch eine positive Zellsortierung isoliert. Hierbei kommt wieder ein für den bestimmten Zelltyp spezifischer zum Einsatz, der auf sonst keinem der übrig gebliebenen Zellen vorhanden ist. Dieses Prinzip wurde bei der Gewinnung von dendritischen Zellen aus dem Blut angewendet.

3.6 Durchflusszytometrie

Das Verfahren der Durchflusszytometrie dient der Analyse großer Zellzahlen. Die einzelnen Zellen werden hierbei nacheinander durch eine Kapillare gesaugt und passieren einen Laserdetektor. Dabei werden sie von einem Laser angestrahlt und ihre Lichtstreuung in zwei verschiedenen Richtungen

gemessen. Neben der Streuung in die Vorwärtsrichtung (*forward scatter*), welche Rückschlüsse auf die Größe der Zelle zulässt, wird zum anderen die Streuung um 90° in die Seitwärtsrichtung (*side scatter*) gemessen, welche eine Aussage über ihre Granularität (innere Zellstruktur) erlaubt. Wird die Zelloberfläche zusätzlich mit Fluorchromen markiert, kann anhand der Emission des Lichtes eine Aussage über die Oberflächenmoleküle der Zelle getroffen werden. Dadurch ist eine Zuordnung der Zelle zu einer bestimmten Zellpopulation möglich.

Für die Durchführung wurden zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen pro Analyseröhrchen eingesetzt. Die Zellen wurden zentrifugiert (4 min, 1500 rpm, bei RT) und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde gewaschen, indem es zweimal in 3 ml FACS-Puffer aufgenommen und dieser anschließend abzentrifugiert wurde. Das gereinigte Zellpellet wurde nun in einem Vielfachen von 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, um später 100 µl pro Antikörperfärbung und Röhrchen einzusetzen. Zusätzlich wurden 20 µl Maus-IgG Antikörper hinzugegeben. Diese sollen eine Blockade der F_c-Rezeptoren an der Oberfläche bewirken, um so eine unspezifische Bindung der Fluoreszenz-Antikörper an die Zelloberfläche zu verhindern. In die für die Analyse vorgesehenen Röhrchen wurden die FITC- und PE-konjugierten Antikörper vorgelegt und anschließend je 100 µl der Zellsuspension pro Röhrchen hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C, wurde zu den einzelnen Analyseröhrchen 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und danach abzentrifugiert (4 min, 1500 rpm, bei RT), um so die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Das verbleibende Zellpellet wurde für die Analyse in 300 µl FACS-Puffer gelöst.

3.7 Isolation von RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA aus DC und verschiedenen weiteren Leukozytensubpopulationen erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Das Prinzip der Methode besteht in der Bindung von RNA-Strängen mit 200 Basenpaaren und mehr an eine

Siliciumdioxid-Säulenmembran (Säulenchromatographie), nachdem die Zellen durch ein Puffergemisch aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol lysiert worden sind. Andere Zellbestandteile, inklusive der DNA, werden in mehreren Waschschritten aus der Säule entfernt und die verbleibende RNA anschließend mit Wasser eluiert. Es können bis zu 100 μ g RNA pro Säule isoliert werden.

3.8 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photospektrometrisch mit dem RNA/DNA Calculator Gene Quant II. Nach Kalibrierung des Nullpunkts mit RNase-freiem Wasser, wurde die Lichtabsorption der einzelnen RNA-Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei war darauf zu achten, dass die Probe luftblasenfrei in die Messküvette eingebracht wurde. Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} kann ein Rückschluss auf die Reinheit der Probe gezogen werden (Zielbereich: 1,8 - 2,0). Für die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde OD_{260} verwendet und von dem Analysegerät intern errechnet.

3.9 Reverse Transkriptase–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die 1983 von Kary Banks Mullis entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Technik, die eine exponentielle Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz ermöglicht. Kleinste DNA-Mengen können so vervielfältigt und damit einfacher charakterisiert und dargestellt werden. Hierfür werden zwei Primer benötigt, kurze zu dem zu analysierenden Strang komplementäre Oligonukleotide, die den entsprechenden Abschnitt einrahmen und als Angriffspunkt für eine thermostabile DNA-Polymerase dienen. Durch einen temperaturgesteuerten sich ständig wiederholenden Zyklus aus Auftrennung des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung der Primer und Polymerisation eines neuen komplementären DNA-Strangs aus einem Überschuss an Nukleotidtriphosphaten kommt es zur Vervielfältigung des gewünschten Abschnitts.

Der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) liegt dasselbe Prinzip zugrunde, nur ist das Ziel der Nachweis einer bestimmten RNA-Sequenz. Hierfür muss zunächst die gesamte RNA einer Zelle mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben werden. Als Primer für die Umschreibung dienen Oligo-dT-Nukleotide, die sich an den Poly-A-Schwanz der RNA anlagern können. Der gesuchte Abschnitt kann dann im Anschluss von der cDNA (*copyDNA*) mit der PCR amplifiziert und nachgewiesen werden.

3.9.1 cDNA-Synthese

Es wurden 400 ng RNA pro Ansatz für die cDNA-Synthese verwendet. Das Volumen wurde entsprechend der RNA-Konzentration berechnet und mit DEPC-Wasser auf 10,75 μl aufgefüllt. Jedem Mikro-Reaktionsgefäß wurden 1 μl Oligo-dT-Primer und 1 μl dNTP-Mix (10 mM) hinzupipettiert, der Ansatz in der PCR-Maschine für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend rasch auf Eis abgekühlt. Zu jedem Reaktionsansatz wurden nun 7,25 μl cDNA-*MasterMix* (Tabelle 3.10) hinzugefügt und nun der eigentliche cDNA-Syntheseschritt in der PCR-Maschine durchgeführt (Erhitzung für 42 min auf 70°C, dann für 5 min auf 90°C, Abkühlung auf 12°C). Die cDNA-Produkte wurden bei –20°C gelagert.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des cDNA-*Mastermix*

Volumen pro Ansatz	Reagenz
4 μl	5x RT-Puffer + 25 mM MgCl
2 μl	0,1 M DTT
1 μl	RNAse-Out
0,25 μl	Superscript-RT (50 U)

3.9.2 PCR-Durchführung

Zuerst wurden die für die PCR benötigten Reagenzien in einem PCR-*Mastermix* (Tabelle 3.3) zusammengestellt und dann je 14 μl in jedes PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden zu jedem Reaktionsansatz 1 μl der entsprechenden cDNA hinzupipettiert und die PCR-Reaktionsgefäße in die PCR-Maschine eingesetzt. Alle beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Neben der PCR mit dem für das Protein P275 spezifischen Primer AF070578-F (*Forward*) und -R (*Reverse*) (PCR-Programm siehe Tabelle 3.4) wurde für jede cDNA auch eine Kontroll-PCR mit Primern für den DNA-Abschnitt der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) durchgeführt (PCR-Programm siehe Tabelle 3.5). Das Enzym GAPDH ist ein Enzym aus dem Zuckerstoffwechsel, das in allen Zellen in ähnlich hohen Konzentrationen vorliegt und daher einen Vergleich der eingesetzten cDNA-Menge zulässt.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des PCR-*Mastermix*

Volumen pro Ansatz	Reagenz
9,6 μl	Ampuwa-Wasser (gereinigt)
1,5 μl	10 \times <i>Reaction Buffer</i> 4
0,9 μl	1,5 mM MgCl_2
0,15 μl	100 μM dNTP
0,5 μl	5 pmol <i>Forward</i> -Primer
0,5 μl	5 pmol <i>Reverse</i> -Primer
0,75 μl	DMSO
0,1 μl	Taq-Polymerase (0,5 U)

Tabelle 3.4: PCR-Programm für Primer AF070578 F+R

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95° C	3 min
10 Zyklen <i>Touchdown</i>	95° C	20 s
$\Delta T = -1^\circ\text{C}$ pro Zyklus	67° C - 57° C	30 s
	72° C	60 s
30 Amplifikationszyklen	95° C	20 s
	57° C	30 s
	72° C	60 s
Terminale Elongation	72° C	7 min
Abkühlung	auf 12° C	∞

Tabelle 3.5: PCR-Programm für GAPDH-Primer (226 bp)

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95° C	3 min
25 Amplifikationszyklen	95° C	15 s
	55° C	15 s
	72° C	30 s
Terminale Elongation	72° C	10 min
Abkühlung	auf 12° C	∞

3.10 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosemoleküle bilden in einem Gel eine netz- bzw. gitterartige Struktur. DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wandern während der Elektrophorese durch diese Gitterstruktur und werden durch den sogenannten Molekularsiebeffekt verschieden stark zurückgehalten. Dadurch kommt es zu einer Auftrennung der DNA-Moleküle, wobei sich die Wanderungstrecke umgekehrt proportional zur Molekülgröße verhält. Durch den Vergleich mit den Banden eines Markers, deren Größe bekannt ist, lässt sich die genaue Größe bestimmen. Die Fragmentlängen, die effizient voneinander getrennt werden, hängen von der Konzentration des Agarosegels ab. Gele mit einer

Konzentration von 0,5 – 2% trennen Fragmentlängen von 0,5 – 25 kb auf. In dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2% verwendet. Die Agarosegele enthalten Ethidiumbromid, welches mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht unter dem Transilluminator wird das Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt, die verschiedenen DNA-Banden werden sichtbar und können dokumentiert werden.

Für die Herstellung eines 2%igen Gels wurden 1 g Agarosepulver abgewogen und 50 ml TAE-Puffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bei 600 W erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurde das Ethidiumbromid hinzupipettiert (0,5 µg/ml), die Flüssigkeit in die Gelträgerform gegossen und anschließend der Kamm für die Ladetaschen eingesetzt. Das polymerisierte Agarosegel wurde in die Elektrophoresekammer eingelegt und diese mit TAE-Puffer befüllt. Das Laden der DNA-Proben erfolgte mit einem 6× Ladepuffer, die Elektrophorese wurde bei einer elektrischen Spannung von 120 V durchgeführt. Als Größenmarker diente die *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*. Für die Analyse und Dokumentation der DNA-Banden wurde das Biometra Bio Doc Analyse Gerät verwendet.

3.11 Zellyse

Für die Gewinnung von Proteinlysate aus den verwendeten Zellen wurde RIPA-Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Material) eingesetzt. Die Proteaseinhibitoren Aprotinin (2 mg/ml) und PMSF (100 mM) wurden kurz vor Lysebeginn zu dem RIPA-Lysepuffer hinzugefügt. Die zu lysierenden Zellen wurden zentrifugiert (1500 rpm, 4 min, RT) und das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer pro 5×10^7 Zellen gelöst. Das Zelllysatzgemisch wurde anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit einer Pipette zehnmal aufgenommen um eine vollständige Lyse zu erreichen. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurde der Inhalt im Anschluss erneut zehnmal resuspendiert. Die Auftrennung von unlöslichem Material und Proteinlysate wurde durch Zentrifugation (fsp, 30 min, 4°C) erreicht. Zuletzt wurde der Überstand abgenommen und in Kryotubes bei –80°C gelagert. Vor der Kryokonservierung

wurde jeweils ein Aliquot von 5 μ l vom Lysat entnommen, mit 20 μ l RIPA-Puffer verdünnt (Verdünnung 1:5) und bei -20°C für die Proteinkonzentrationsbestimmung eingefroren.

3.12 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Reagent Kit*. Zwecks Doppelbestimmung wurden je $2 \times 10 \mu\text{l}$ des verdünnten RIPA-Proteinlysats in eine 96-Loch-Gewebekulturplatte vorgelegt. Zusätzlich wurden jeweils $2 \times 10 \mu\text{l}$ von Standardproteinlösungen auf die 96-Loch-Gewebekulturplatte aufgetragen. Die BSA-Standards besaßen die Konzentrationen 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,38 mg/ml, 0,18 mg/ml und 0,09 mg/ml. Anschließend wurden je 200 μl des BCA-Reaktionsgemisches (Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1) pro Well hinzupipettiert. Da die Standardproteinlösungen mit NP-40 Lysepuffer verdünnt sind, wurden auch $2 \times 10 \mu\text{l}$ NP-40 Lysepuffer auf die 96-Loch-Gewebekulturplatte aufgetragen, um so später den RIPA-NP40 Unterschied rechnerisch ausgleichen zu können. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C , wurde die 96-Loch-Gewebekulturplatte mit dem ELISA-Gerät ausgewertet.

3.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Elektrophoresetechnik, die der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht dient. Durch den Einsatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) kommt es zu einer negativen Ladung der aufzutrennenden Proteine. Die Wechselwirkung von SDS mit den Proteinen überdeckt die ursprüngliche Ladung dieser, wobei der Quotient aus Molekulargewicht und Ladung konstant ist. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wird dem Probenpuffer Dithiothreitol (DTT) beigemischt, und zusätzlich werden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min auf 100°C erhitzt, um damit die Sekundär- und Tertiärstruktur zu zerstören. Somit erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Proteine streng nach ihrem Molekulargewicht. Es wird eine diskontinuierliche Elektrophorese eingesetzt,

d.h. das Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.6 und 3.7). Durch das Sammelgel wird eine Verdichtung der Proteine und damit eine verbesserte Trennleistung im Trenngel erreicht. Das Elektrophoresegel wurde in 2 Schritten hergestellt. Zuerst erfolgte das Gießen des Trenngels mit Abdeckung der Geloberkante durch Isopropanol, um eine ungestörte Polymerisation zu ermöglichen. Danach schloss sich das Gießen des Sammelgels mit Einsetzen des Kamms für die späteren Ladetaschen an.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung Trenngel (15% Acrylamid), SDS-PAGE

Reagenz	Volumen (für 2 Gele)
ddH ₂ O	1,75 ml
1 M Tris pH 8,8	5,6 ml
30% Acrylamid	7,5 ml
10% SDS	150 µl
TEMED	10 µl
10% APS	100 µl

Tabelle 3.7: Zusammensetzung Sammelgel, SDS-PAGE

Reagenz	Volumen (für 2 Gele)
ddH ₂ O	6 ml
2 M Tris pH 6,7	2 ml
30% Acrylamid	6 ml
10% SDS	100 µl
TEMED	10 µl
10% APS	100 µl

Der für die SDS-PAGE benötigte 1× *Running Buffer* wurde aus einer 10× *Running Buffer*-Stocklösung (Zusammensetzung siehe Material 2.9) hergestellt. Aus der Proteinkonzentration der einzelnen Lysate wurde das Volumen errechnet, welches 20 µg Protein enthält und mit RIPA-Lysepuffer auf 20 µl

aufgefüllt. Die einzelnen Proben wurden mit 10 μ l 3 \times Sample Buffer/30% 1 M DTT gemischt und nach Erhitzen auf 100°C (4 min) in die Ladetaschen aufgetragen. Als Größenmarker wurden 7 μ l des *Bench MarkTM Prestained Protein Ladder* Markers und 15 μ l des *Low Range* Markers (BioRad) eingesetzt, letzterer nach Erhitzen auf 100°C für 30 Sekunden. Für die Elektrophorese wurde eine konstante elektrische Spannung von 120 V angelegt.

3.14 Western Blot

Mit der Methode des Western Blots werden die in der Elektrophorese zuvor aufgetrennten Proteinbanden aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und können dann mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Hierfür wurde eine Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf das Acrylamidgel aufgelegt und das System zwischen zwei Whatman-Papieren und zwei Schwämmen in die Blottingkammer eingespannt (siehe Abbildung 3.1). Aufgrund der negativen Ladung der Proteine, wandern diese von der Kathode Richtung Anode.

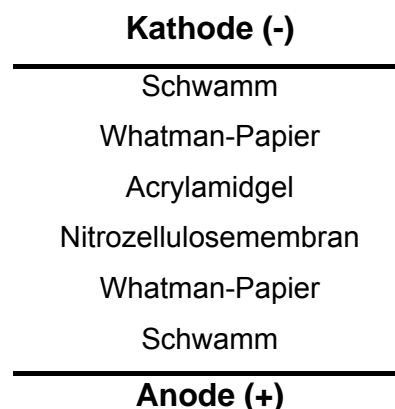


Abbildung 3.1: Anordnung des Blottingsystems

Die Blottingkammer wurde nach Einsatz des Kühlelements und eines Magnetrührers mit 4°C kaltem 1 \times Transferpuffer (Zusammensetzung siehe Material Tabelle 2.9) befüllt. Der Proteintransfer erfolgte im Kühlraum bei 4° C für 1 h mit einer elektrischen Stromstärke von konstant 250 mA.

Nach Beendigung des Transfervorgangs wurde die Nitrozellulosemembran aus dem Blottingsystem entnommen und die Banden des *Prestained* Markers mit

Bleistift nachgezeichnet. Um später keine unspezifische Bindung der Antikörper an die Teile der Nitrozellulosemembran ohne bisherige Proteinbindung zu erhalten, wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 4% *SlimFast*-Lösung geblockt. Nach Abtrennung des biotinylierten *LowRange*-Markers vom Rest der Membran mittels Skalpell, konnte die Membran entweder über Nacht bei 4° C im Kühlraum oder für 1 h bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper inkubiert werden. Der polyklonale Antikörper gegen P275 wurde in der Konzentration 1:100 in 2,5% *SlimFast*-Lösung eingesetzt. Im Anschluss an die Inkubation mit dem 1. Antikörper wurde die Membran 3× für jeweils 5 min mit TBS/0,5% Tween gewaschen. Als 2. Antikörper wurde ein anti-Kaninchen HRP-markierter Antikörper (1:2000 in 2,5% SFL) für die Bindung an den spezifischen P275-Ak bzw. HRP-markiertes Streptavidin für die Bindung an den biotinylierten *LowRange*-Marker verwendet. Die Inkubationszeit für beide Ansätze betrug jeweils 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der 2. Ak bzw. das Streptavidin über mehrere Waschschrte entfernt (2× 5 min TBS/0,5% Tween, 1× 4 min TBS/3% Tween, 2× 5 min TBS/0,5% Tween, 2× 5 min TBS). Da der 2. Ak bzw. das Streptavidin mit einer Peroxidase konjugiert sind, ist eine Detektion mit dem ECLTM Plus System möglich. Hierfür wird die Membran mit 2 ml ECLTM-Reaktionsgemisch (Reagenz 1 zu Reagenz 2 im Verhältnis 1:1) für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Peroxidase oxidiert das in dem ECLTM-Reaktionsgemisch enthaltene Substrat Lumigen PS-3 Acriden und regt es damit zur Lumineszenz an. Die Dokumentation erfolgte durch die Belichtung eines Audiographiefilms in einer Röntgenfilmkassette und der anschließenden Entwicklung der Filme mit dem Entwicklungsgerät.

Um eine Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen zu erhalten, wurde die Nitrozellulosemembran später mit einem von der Maus stammenden anti-GAPDH-Antikörper (1:5000 in 2,5% SFL) bzw. mit einem von der Ziege stammenden anti-Actin-Antikörper (1:500 in 2,5% SFL) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde als 2. Antikörper ein HRP-konjugierter anti-Maus-Antikörper (1:2000 in 2,5% SFL) bzw. ein HRP-konjugierter anti-Ziegen-Antikörper (1:2000 in 2,5% SFL) eingesetzt. Die

dazwischen liegenden Waschschrirte glichen den oben aufgeföhrtcn. Die Visualisierung erfolgte ebenfalls durch das ECL™ Plus System.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der differentiellen Expression des Gens p275 in Monozyten und dendritischen Zellen

Für den Nachweis der differentiellen Expression von P275 wurden Monozyten über Adhärenz aus *buffy coats* isoliert und dann aus diesen über 7 Tage DC generiert. Sowohl von den Monozyten als auch von den DC wurde RNA isoliert und Proteinlysate hergestellt. Die entstandenen DC wurden in der Durchflusszytometrie auf ihren Phänotyp untersucht.

4.1.1 Phänotyp der verwendeten DC

Das in Tabelle 4.1 aufgeführte Antikörperpanel wurde für die phänotypische Charakterisierung der dendritischen Zellen eingesetzt.

Tabelle 4.1: Phänotypbestimmung für aus Monozyten generierte DC

Ansatz	FITC-konj. Ak	Spezifität	PE-konj. Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD 1a	Unreife DC, Thymozyten	CD 83	Reife DC
3	CD 14	Monozyten	HLA-DR	MHC Klasse II
4	CD 19	B-Zellen	CD 3	T-Zellen
5	CD 86	Costimul. Molekül	CD 80	Costimul. Molekül

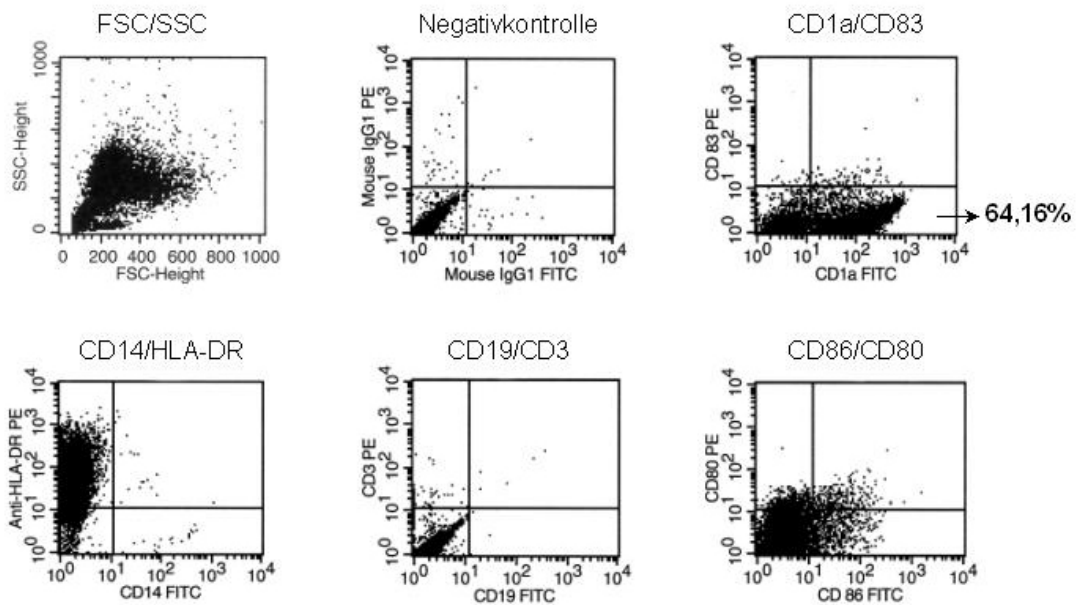


Abbildung 4.1: Phänotypisierung von aus Monozyten generierten DC. In der Mitte der oberen Zeile ist die Isotypenkontrolle dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder.

In der Phänotypanalyse der DC zeigt sich, dass 64,16% der untersuchten Zellen Träger von CD1a, ein für DC spezifisches Oberflächenmolekül, sind. Beinahe alle Zellen sind CD14 (spezifisch für Monozyten) negativ und HLA-DR (MHC II) positiv. Des weiteren sind die Zellen für CD 3 (spezifisch für T-Lymphozyten) und CD 19 (spezifisch für B-Lymphozyten) negativ. In der Gesamtheit zeigt die Analyse eine DC-Reinheit von 64,16% mit nur geringen Verunreinigungen durch Lymphozyten.

4.1.2 Nachweis der Aktivierung des Gens p275 in DC mit RT-PCR

Aus den Monozyten und dendritischen Zellen wurde die RNA isoliert und mit Hilfe der RT-PCR die Transkription des Gens für das Protein p275 untersucht.

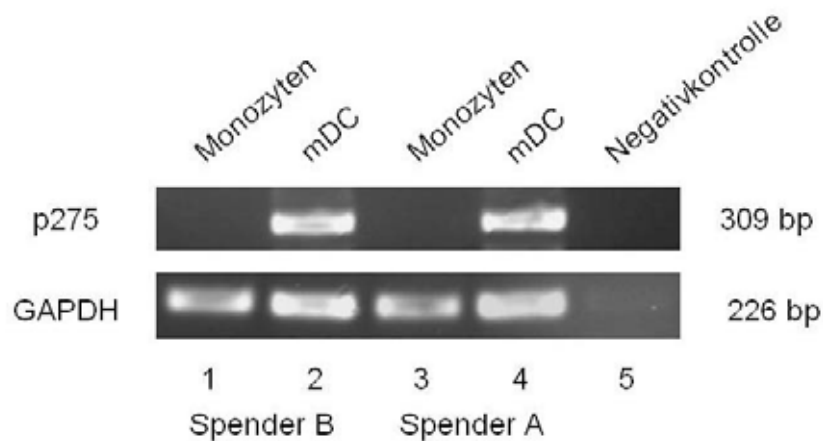


Abbildung 4.2: Darstellung der RT-PCR für die differentielle Transkription des Gen p275. In der RT-PCR wurden zwei verschiedene Spender untersucht. In Spur 1 und 3 sind die Monozyten, in Spur 2 und 4 die jeweils daraus generierten DC dargestellt. Die Negativkontrolle ohne cDNA im PCR-Ansatz ist in Spur 5 zu sehen. Zur Kontrolle wurden Primer gegen GAPDH eingesetzt. Alle Größenangaben in Basenpaaren. Als Größenmarker wurde die *1kb-DNA-Ladder* verwendet (nicht abgebildet).

Die dendritischen Zellen beider Spender weisen ein starkes Signal auf (Spur 2,4), während bei den jeweiligen Monozyten keine Banden zu erkennen sind. Dies zeigt, dass nur in den DC ein Transkript, d.h. mRNA für das Gen p275, vorhanden ist. Die Kontroll-PCR mit GAPDH ergibt gleichmäßig starke Signale und stellt somit sicher, dass gleiche Mengen an cDNA eingesetzt wurden und es sich nicht um falsch-negative Ergebnisse handelt.

4.2 Nachweis der Spezifität des verwendeten Antikörpers für das Protein P275

Zunächst wurde die Spezifität des generierten polyklonalen Antikörpers für das Protein P275 mit einem Peptidblockversuch untersucht. Hierfür wurden die Proteinlysate von Monozyten und den daraus generierten DC eines Spenders zweimal mit der SDS-PAGE in insgesamt 4 Spuren aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot wurde ein Monozyten–DC Paar mit der üblichen 1. Antikörperkonzentration von 1:100 inkubiert, das zweite Paar wurde mit 1. Antikörperlösung inkubiert, die zuvor 30 min bei Raumtemperatur mit dem Vakzinierungspeptid (25 µg/ml) vorinkubiert worden war. Hiermit soll eine Blockade der spezifischen Antikörperbindungsstellen erreicht werden. Das

Vakzinierungspeptid stammt vom Hersteller des Antikörpers (Firma Pineda Antikörperservice, Berlin).

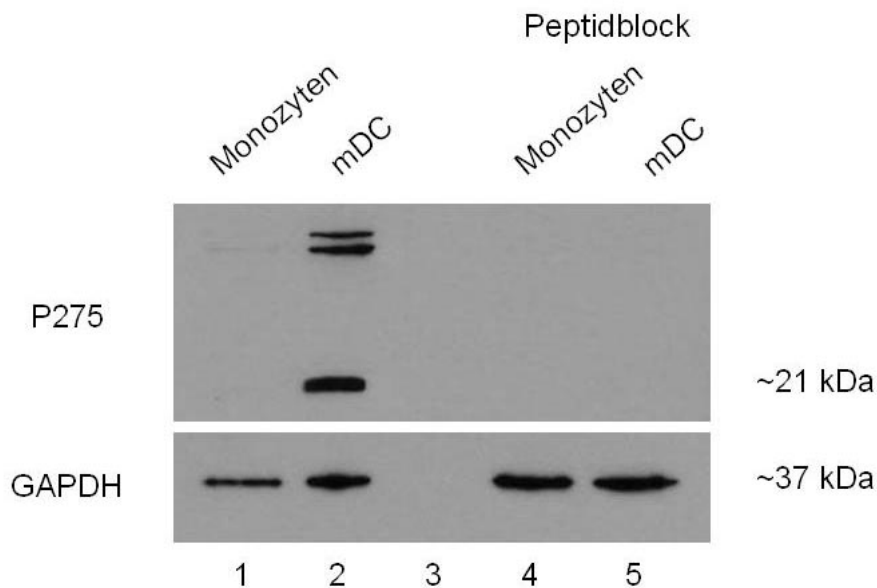


Abbildung 4.3: Darstellung des Western Blots mit dem gegen P275 gerichteten Antikörper in Spur 1 und 2 und dem mit Peptid vorinkubierten Antikörpergemisch in Spur 4 und 5. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Antikörper gegen GAPDH eingesetzt. Grössenangaben in kDa. Als Grössenmarker diente der biotinylierte LowRange-Marker (nicht abgebildet).

In Spur 2, den aus Monozyten generierten DC, ist eine Bande bei 21 kDa und zwei weitere Banden mit jeweils deutlich größerem Molekulargewicht zu erkennen. Diese Banden fehlen in Spur 1 bei den dazugehörigen Monozyten. In den Spuren 4 und 5 mit dem durch das Peptid blockierten Antikörper ist weder bei den Monozyten (4) noch bei den DC (5) ein Signal sichtbar. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen und um ein falsch negatives Ergebnis auszuschließen, wurde ein polyklonaler GAPDH-Antikörper eingesetzt. Dem entsprechend sind in allen 4 Spuren (1,2,4,5) bei 37 kDa Banden in ähnlicher Intensität vorhanden. Spur 3 wurde zur besseren Übersichtlichkeit nicht mit Protein beladen.

4.3 Nachweis der Expression des Proteins P275 in DC

Neben der differentiellen Transkription des Gens p275 wurde bei den selben Spendern die Expression des Proteins mit Western Blot untersucht. Es wurden

20 µg Protein pro Spur geladen. Der 1. Antikörper gegen P275 wurde in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt.

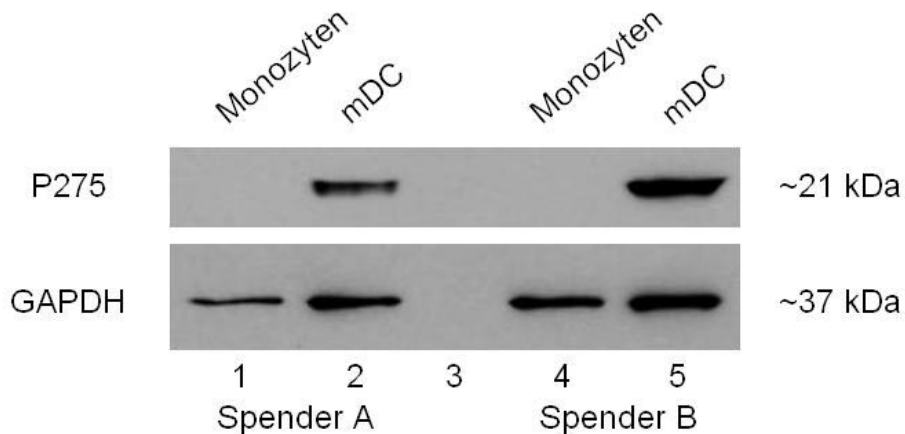


Abbildung 4.4: Darstellung des Western Blot für die differentielle Expression des Protein P275. Es wurden zwei verschiedene Spender untersucht. In Spur 1 und 4 sind die Monozyten, in Spur 2 und 5 die jeweils daraus generierten DC dargestellt. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Antikörper gegen GAPDH eingesetzt. Als Größenmarker diente der biotinylierte *LowRange*-Marker (nicht abgebildet).

Bei der Western Blot Untersuchung zeigt sich bei den DC beider Spender eine Bande (Spur 2, 4). Die dazu gehörigen Monozyten weisen beide kein Signal in diesem Bereich auf (Spur 1, 3). Dieses Ergebnis bestätigt die selektive Expression von P275 nur in DC und nicht in Monozyten auf Ebene des Proteins, entsprechend den in der RT-PCR gewonnenen Ergebnisse. Die zur Kontrolle durchgeführte Untersuchung auf GAPDH zeigt, dass die Proteinmengen gleichmäßig eingesetzt wurden. Spur 3 wurde zur besseren Übersichtlichkeit nicht mit Protein beladen.

4.4 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der Expression von P275 in der Entwicklung von DC

Um den zeitlichen Verlauf der Aktivierung des Proteins P275 näher zu charakterisieren, wurde sowohl eine RT-PCR Kinetik als auch eine Western Blot Kinetik durchgeführt. CD14-positive Zellen wurden durch Zellsortierung aus PBMC gewonnen, auf Kulturplatten mit IL-4 und GM-CSF kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet.

4.4.1 Charakterisierung des Verlaufs der Transkription des Gens p275 durch RT-PCR

Für die Untersuchung der Transkription wurde zunächst ein Versuch durchgeführt, indem die eingesetzten Zellen in einem Abstand von 24 h geerntet wurden (Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h). Sowohl der Phänotyp der gesorteten Monozyten (Zeitpunkt 0 h), als auch der Phänotyp der daraus generierten DC (Zeitpunkt 144 h) wurden in der Durchflusszytometrie überprüft. Es wurden 2 verschiedene Spender untersucht.

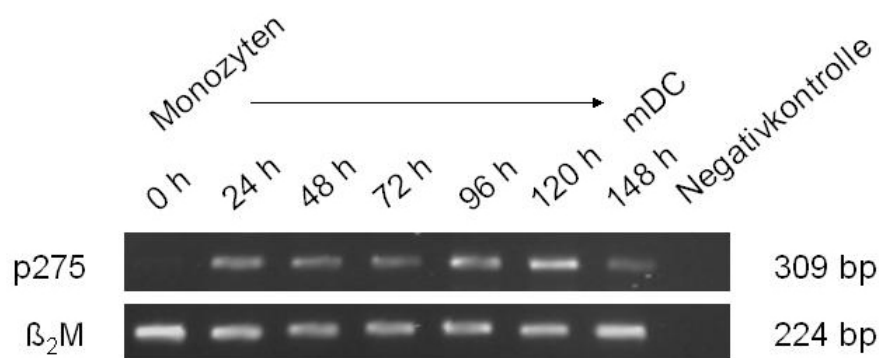


Abbildung 4.5: Darstellung der 148 h RT-PCR Kinetik. Der zeitliche Abstand der Untersuchungszeitpunkte beträgt 24 h. Zur Kontrolle wurden Primer gegen β₂-Mikroglobulin eingesetzt. Alle Größenangaben in Basenpaaren. Als Größenmarker wurde die *1kb-DNA-Ladder* verwendet (nicht abgebildet).

In der RT-PCR ist bereits nach 24 h ein Signal vorhanden, das in seiner Intensität stetig zunimmt. D.h. schon zu diesem Zeitpunkt liegt ein mRNA-Transkript in den Zellen vor. Um diese Zeitspanne noch näher aufzuschlüsseln, wurde eine weitere RT-PCR Kinetik mit geringeren Zeitabständen in den ersten 24 h angeschlossen. Der Versuchsaufbau und -ablauf glich dem bereits beschriebenen. In diesem 2. Versuch wurden die Zellen diesmal innerhalb der ersten 24 h in kürzeren Intervallen geerntet (Zeitpunkte 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24h). Auch dieser Versuch wurde an 2 unterschiedlichen Spendern durchgeführt.

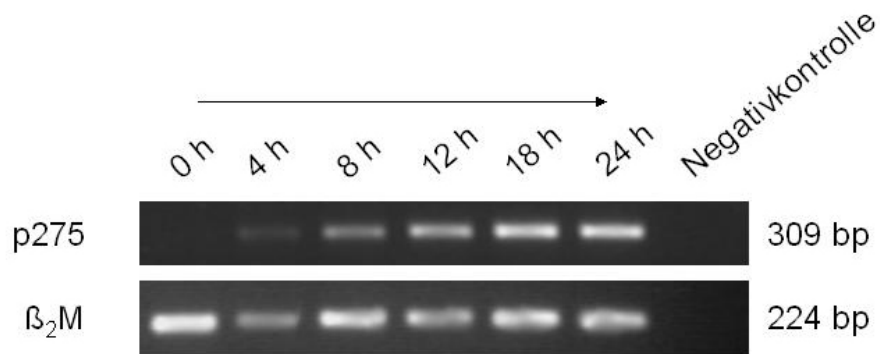


Abbildung 4.6: Darstellung der 24 h RT-PCR Kinetik. Der zeitliche Abstand der Untersuchungszeitpunkte beträgt 4 h bzw. 6 h. Zur Kontrolle wurden Primer gegen β_2 -Mikroglobulin eingesetzt. Alle Größenangaben in Basenpaaren. Als Größenmarker wurde die *1kb-DNA-Ladder* verwendet (nicht abgebildet).

In dieser zweiten enger abgestuften RT-PCR Kinetik ist eine schwache Bande für das Transkript von p275 nach 4 h zu erkennen, die im weiteren Verlauf zu den späteren Zeitpunkten in ihrer Intensität stetig zunimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass mRNA für das Protein P275 bereits nach den ersten 4 h, während der Differenzierung der DC aus Monozyten, induziert wird. Als Kontrolle wurde in beiden Versuchen eine PCR mit Primern für β_2 -Mikroglobulin durchgeführt.

4.4.2 Charakterisierung des Verlaufs der Expression von P275 durch Western Blot

Nach der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Transkription des Gens für p275, interessierte nun der Verlauf der eigentlichen Expression des Proteins in den sich entwickelnden DC. Hierfür wurden nach der Gewinnung von Monozyten aus PBMC über Adhärenz, diese mit den entsprechenden Zytokinen IL-4 und GM-CSF inkubiert und nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 144 h geerntet. Die Zellen wurden in jeweils 100 μ l RIPA-Lysepuffer pro Zeitpunkt lysiert. Bei dem durchgeführten Western Blot wurde eine Proteinmenge von jeweils 10 μ g eingesetzt. Die Verdünnung des 1. Antikörpers gegen P275 betrug 1:100. Der Versuch wurde an 2 verschiedenen Spendern durchgeführt.

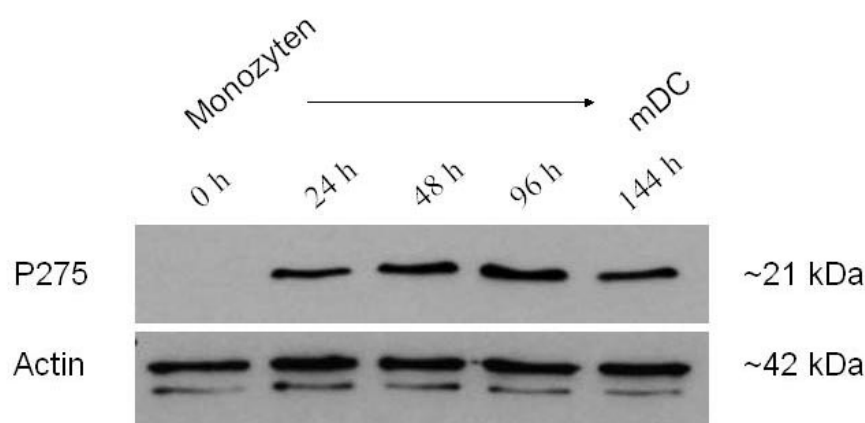


Abbildung 4.7: Darstellung der Western Blot-Kinetik. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h, 96 h, 144 h lysiert. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Actin eingesetzt. Als Größenmarker diente der biotinylierte *LowRange*-Marker (nicht abgebildet).

Wie bereits in der RT-PCR Kinetik erkannt, kommt es während der Entwicklung der DC aus Monozyten zu einem sehr frühen Zeitpunkt zur Aktivierung des Gens p275. In der Western Blot Untersuchung ist somit erwartungsgemäß bereits nach 24 h ein Signal bei 21 kDa zu erfassen und damit eine Expression von P275 in den Zellen nachzuweisen. Die Banden nehmen in ihrer Intensität an den späteren Zeitpunkten der Entwicklung noch leicht zu. Für die Kontrollreaktion zur Erfassung der eingesetzten Proteinmengen wurde ein Actin-Antikörper verwendet (42 kDa). Die zusätzlich unterhalb sichtbaren Banden stammen von einem zuvor durchgeführten GAPDH-Nachweis, bei dem das ECLTM Plus System bei der Entwicklung zunächst versagt hatte.

4.5 Einfluss von Stimuli auf die Expression von P275

Bei der in-vitro Generierung von DC aus Monozyten können neben den Zytokinen IL-4 und GM-CSF zusätzlich Stimulantien hinzugegeben werden, die eine Aktivierung der DC bewirken (siehe 3.3, Tabelle 3.1). Es wurden Versuche mit Proteinlysaten von ebenso stimulierten DC unternommen, um zu analysieren, ob die Stimulation von DC zu einer Änderung in der Expression von P275 führt. Die eingesetzten Proteinlysate stammen aus dem Überstand von Kernextrakten und wurden in der maximal möglichen Menge geladen

(10,75 μ l Volumen pro Ansatz), der 1. Antikörper gegen P275 wurde in der üblichen Konzentration von 1:100 verwendet. Es wurden die Stimulantien TNF- α , CD40L+IFN γ , IFN α , TLR2L (Pam₃Cys), TLR3L (PolyI:C), TLR4L (LPS) und TLR7L (R848) untersucht. Die einzelnen Stimulantien sind in DMSO als Lösungsmittel verdünnt, daher wurde eine Kontrollprobe mit DMSO mituntersucht, um eine unspezifische Regulation durch DMSO auszuschließen. Zusätzlich wurde eine Vergleichsprobe mit nicht stimulierten DC hinzugefügt. Insgesamt wurden 3 verschiedene Spender untersucht.

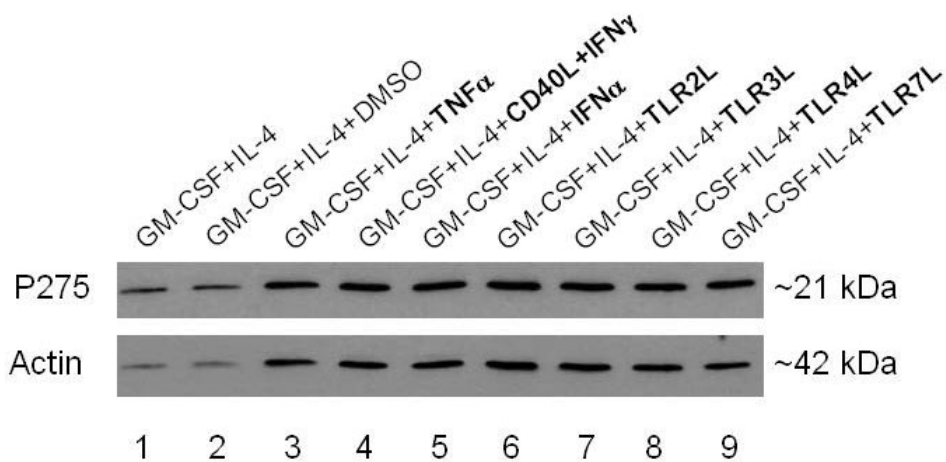


Abbildung 4.8: Darstellung des Western Blots mit stimulierten DC. Spur 1 zeigt unreife DC (nur GM-CSF und IL-4), Spur 2 die Kontrollprobe (zusätzlich DMSO), Spur 3-9 DCs mit verschiedenen Stimulantien. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Actin eingesetzt. Als Größenmarker diente der biotinylierte *LowRange*-Marker (nicht abgebildet).

Die Western Blot-Analyse der stimulierten DC zeigt in allen sieben stimulierten DC-Populationen eine ähnlich starke Konzentration des Protein P275. Die Probe mit den unstimulierten DC (Spur 1) und der DMSO-Kontrollprobe (Spur 2) weisen ein schwächeres Signal auf. In der Actinkontrolle zeigt sich jedoch, dass dies mit einer geringeren Proteinmenge in den beiden ersten Spuren zusammenhängt und dass die übrigen Spuren gleichmäßig geladen wurden. Eine Regulation von P275 durch eine der Stimulantien ist aus diesen Versuchen nicht abzuleiten.

4.6 Einfluss von Inhibitoren der DC-Entwicklung auf die Expression von P275

Neben der Stimulation der Entwicklung von DC durch bestimmte Substanzen, ist auch eine Entwicklungshemmung der Monozyten zu DC durch andere Faktoren möglich (IL-10, Imatinib, Troglitazone, siehe 3.3 und Tabelle 3.1). Ob es durch den Einsatz dieser Stoffe auch zu einer Inhibition der Proteinexpression von p275 kommt, wurde mit einer Western Blot Analyse an drei verschiedenen Spendern untersucht. Die eingesetzten Proteinlysate stammen aus dem Überstand von Kernextrakten. Es wurden die maximale Proteinmenge (10,75 µl Volumen pro Ansatz) geladen und der 1. Ak in der Verdünnung von 1:100 verwendet. Es wurde zusätzlich, wie bei den oben beschriebenen Versuchen mit stimulierten DC, eine Kontrollprobe mit DMSO und eine Probe mit nicht stimulierten DC eingesetzt.

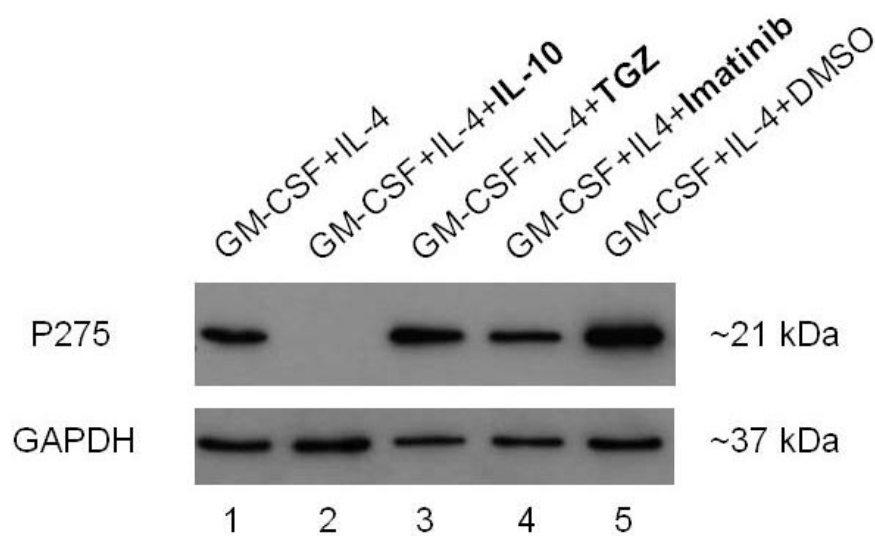


Abbildung 4.9: Darstellung des Western Blots mit entwicklungsgehemmten DC. Spur 1 zeigt nicht stimulierte DC (nur GM-CSF und IL-4), Spur 5 die Kontrollprobe (zusätzlich DMSO), Spur 2-4 DC mit verschiedenen Inhibitoren (IL-10, Troglitazone, Imatinib). Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Actin eingesetzt. Als Größenmarker diente der biotinylierte *LowRange*-Marker (nicht abgebildet).

In der Abbildung des Western Blot ist eindeutig zu erkennen, dass bei dem Zusatz von IL-10 kein Protein P275 detektiert werden kann. Die beiden anderen Inhibitoren Troglitazone und Imatinib hingegen führen zu keiner klaren Veränderung der Proteinexpression. Dieses Ergebnis wurde auch bei vier

weiteren untersuchten Spendern festgestellt. Die GAPDH-Kontrollfärbung zeigt, dass die eingesetzten Proteinmengen vergleichbar sind und kein falschnegatives Ergebnis vorliegt.

4.7 Expression von P275 in verschiedenen Leukozyten Subpopulationen

Nachdem die differentielle Expression von P275 in dendritischen Zellen gegenüber Monozyten gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage in wie weit das Protein P275 spezifisch für DC ist oder ob es auch in Lymphozyten exprimiert wird. Außerdem interessierte das Vorkommen in den weiteren DC Subpopulationen.

4.7.1 Phänotypisierung von Monozyten, Lymphozyten und verschiedenen Subpopulationen dendritischer Zellen

Die Gewinnung der verschiedenen Zellpopulationen für die RT-PCR und Western Blot-Versuche erfolgte über magnetische Zellsortierung (siehe 3.5). Anschließend wurde die Reinheit der isolierten Zellen mit der Durchflusszytometrie analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Phänotypuntersuchung für die einzelnen Zellarten dargestellt.

4.7.1.1 Monozyten

Monozyten wurden bereits in den vorangegangenen Versuchen verwendet und dabei über Adhärenz oder magnetische Zellsortierung isoliert. Im Folgenden wird auf ihre phänotypische Charakterisierung eingegangen. Die hier gezeigten Abbildungen der FACS-Analyse stammen von Monozyten, die durch positive magnetische Zellsortierung aus PBMC gewonnen wurden. In Tabelle 4.2 ist das verwendete Antikörperpanel aufgeführt.

Tabelle 4.2: Phänotypbestimmung für Monozyten

Ansatz	FITC-konj. Ak	Spezifität	PE-konj. Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD 14	Monozyten	CD 56	NK-Zellen
3	CD 19	B-Zellen	CD 3	T-Zellen

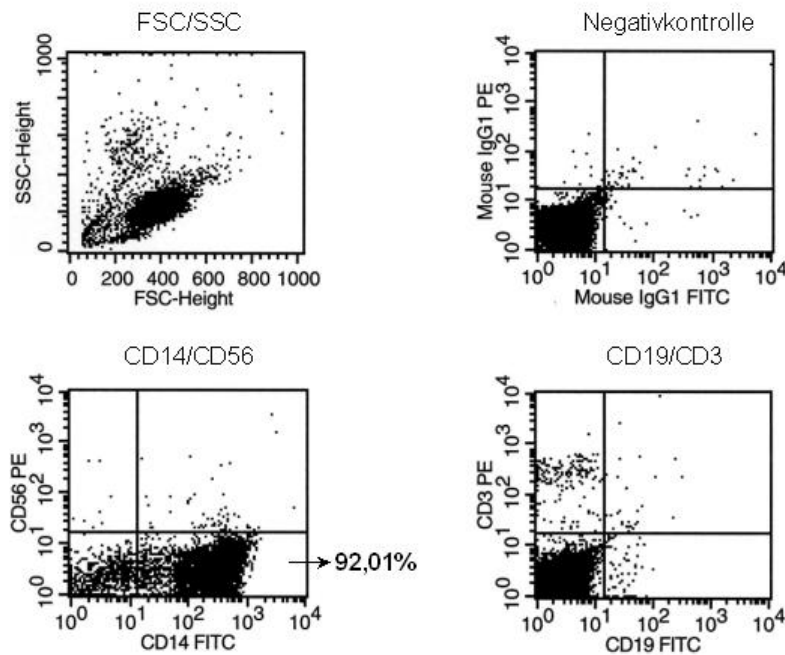


Abbildung 4.10: Darstellung der FACS-Analyse von Monozyten. Rechts oben ist die Isotypenkontrolle dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Ak-Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder.

Der Plot CD14 FITC-Ak gegen CD56 PE-Ak (links unten in Abbildung 4.10) zeigt, dass 92,01% aller Zellen nach dem Vorgang der magnetischen Zellsortierung CD14 positiv sind. Da das CD14 Oberflächenmolekül für Monozyten spezifisch ist, heißt dies, dass es sich bei den untersuchten Zellen zu 92,01% um Monozyten handelt. Die weitere Analyse mit CD19 FITC- und CD3 PE-Antikörper zielt auf den Anteil der Lymphozyten in der Population ab (Plot rechts unten in Abbildung 4.1).

4.7.1.2 B- und T-Lymphozyten

Um ein Vorkommen des Proteins P275 in Lymphozyten zu untersuchen, wurden diese ebenfalls mit der magnetischen Zellsortierung aus den PBMC isoliert. Lymphozyten werden in B- und T-Lymphozyten unterteilt, wobei das CD3 Molekül spezifisch für T- und das CD19 Molekül spezifisch für B-Lymphozyten ist. Im Falle der B-Lymphozyten erfolgte die Isolation über Ak gegen CD19, die FACS-Analyse jedoch über Ak gegen CD20, welches ebenfalls für B-Lymphozyten spezifisch ist. Die verwendeten Antikörperfärbungen sind in den Tabellen 4.3 und 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.3: Phänotypbestimmung für T-Lymphozyten

Ansatz	FITC-konj. Ak	Spezifität	PE-konj. Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD 14	Monozyten	CD 19	B-Zellen
3	CD 3	T-Zellen	CD 56	NK-Zellen

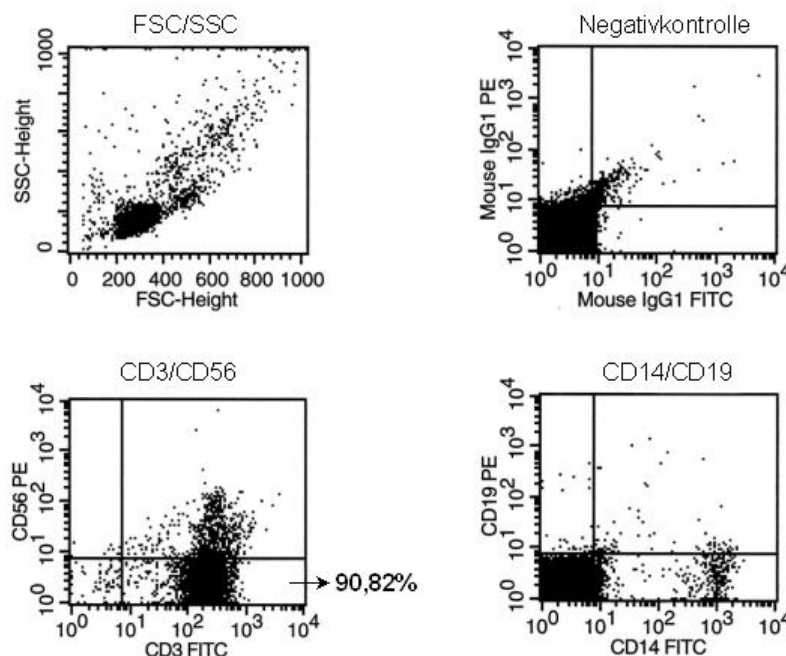


Abbildung 4.11: Darstellung der FACS-Analyse von T-Lymphozyten. Rechts oben ist die Isotypenkontrolle dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Ak-Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder.

Tabelle 4.4: Phänotypbestimmung für B-Lymphozyten

Tabelle 4.4: Phänotypbestimmung für B-Lymphozyten

Ansatz	FITC-konj. Ak	Spezifität	PE-konj. Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD 14	Monozyten	CD 3	T-Zellen
3	CD 20	B-Zellen	CD 56	NK-Zellen

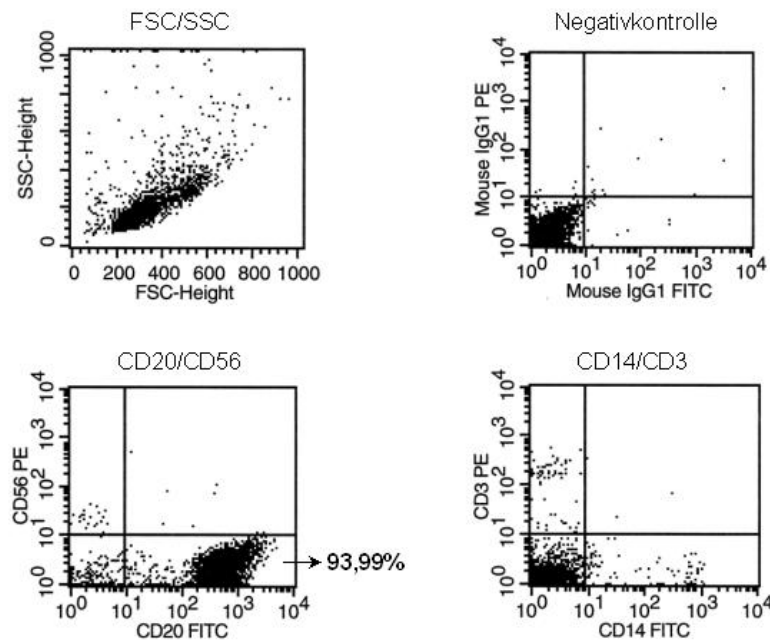


Abbildung 4.12: Darstellung der FACS-Analyse von B-Lymphozyten. Rechts oben ist die Isotypenkontrolle dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Ak-Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder.

Wie bereits bei den Monozyten gezeigt wurde, können mit der magnetischen Zellsortierung sehr hohe Reinheitsgrade der isolierten Zellen erreicht werden. Auch bei den B- und T-Lymphozyten wurden Werte über 90% erreicht, im einzelnen 90,82% bei den analysierten T-Lymphozyten (Abbildung 4.11 links unten) und 93,99% bei den B-Lymphozyten (Abbildung 4.12 links unten). Die zweite Ak-Färbung erfolgte jeweils gegen die andere Lymphozytenart und gegen Monozyten (siehe Abbildungen 4.11 und 4.12, rechts unten).

4.7.1.3 DC aus CD34-positiven Stammzellen

Neben der Entwicklung von DC aus Monozyten ist auch eine Generierung von DC aus CD34-positiven Stammzellen möglich (siehe 3.4). Auch diese Zellen wurden mit Hilfe der FACS-Analyse auf ihren genaueren Phänotyp untersucht. In Tabelle 4.5 sind die hierfür verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 4.5: Phänotypbestimmung für aus CD34-positiven Stammzellen generierte DC

Ansatz	FITC-konj. Ak	Spezifität	PE-konj. Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD 1a	Unreife DC, Thymozyten	CD 83	Reife DC
3	CD 14	Monozyten	HLA-DR	MHC Klasse II

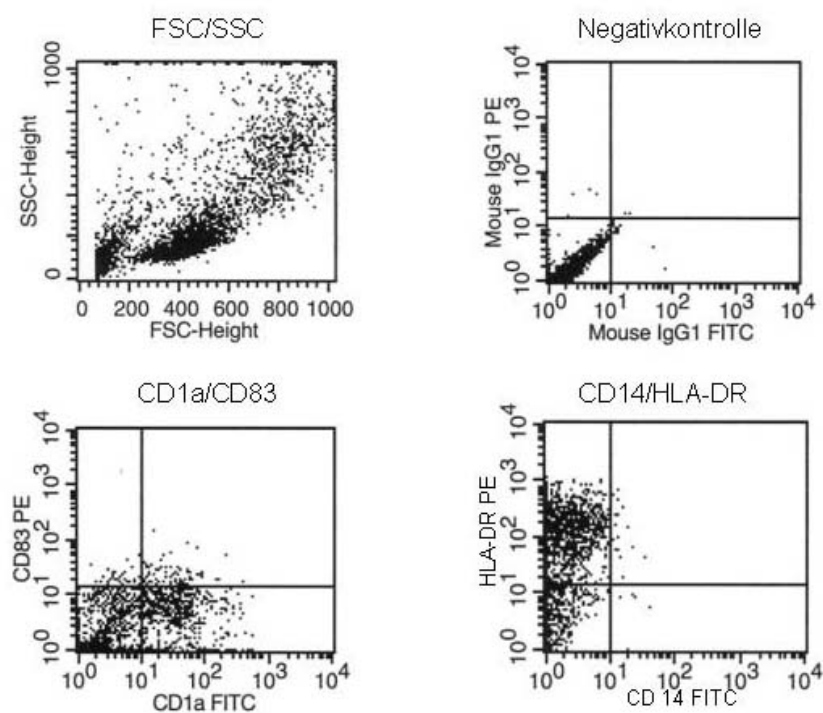


Abbildung 4.13: Darstellung der FACS-Analyse von aus CD34-positiven Stammzellen generierten DC. In der Mitte ist die Isotypenkontrolle dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Ak-Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder.

4.7.1.4 Plasmazytoide DC, DC aus dem Blut und CD1c-positive DC

DC können nicht nur aus Monozyten und CD34-positiven Stammzellen generiert, sondern die verschiedenen Subpopulationen auch direkt aus dem Körper bzw. Spenderblut isoliert werden. Dies ist im Falle der DC aus dem Blut durch eine Zelldepletion mittels magnetischer Zellsortierung möglich oder wie bei den plasmazytoiden DC (BDCA4⁺) und CD1c-positiven DC durch eine klassische positive Zellsortierung. Die verwendeten Zellmarker in der FACS-Analyse bzw. die Antikörper sind in den Tabellen 4.6, 4.7, 4.8 dargestellt. Bei der phänotypischen Analyse der CD1c-positiven DC wurden im Gegensatz zu allen anderen FACS-Färbungen drei verschiedene Fluoreszenzantikörper (FITC, PE und PerCP-konjugiert) verwendet. Hierbei handelte es sich bei dem FITC-markierten Antikörper um einen gegen Biotin gerichteten Antikörper, der an den BDCA1-MACS-Antikörper im Sinne eines sekundär Antikörpers bindet und somit den DC-Marker BDCA1 nachweist.

Tabelle 4.6: Phänotypbestimmung für plasmazytoide DC

Ansatz	FITC-konj. Ak	Spezifität	PE-konj. Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	BDCA 2	Plasmazytoide DC	CD 123	Granulo-, Megakaryo-, Monozyten

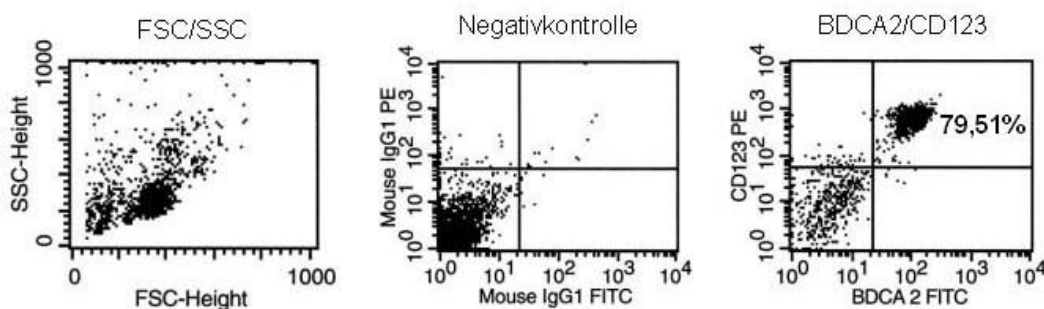


Abbildung 4.14: Darstellung der FACS-Analyse von plasmazytoiden DC. In der Mitte ist die Isotypenkontrolle dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Ak-Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder.

Tabelle 4.7: Phänotypbestimmung für DC aus peripherem Blut

Ansatz	FITC-konj. Ak	Spezifität	PE-konj. Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	HLA-DR	MHC Klasse II	Ak-Mix*	NK-, B-, T-, plasmazytoide Zellen

* Ak-Mix = CD11b, CD56, CD19, TCRa/b

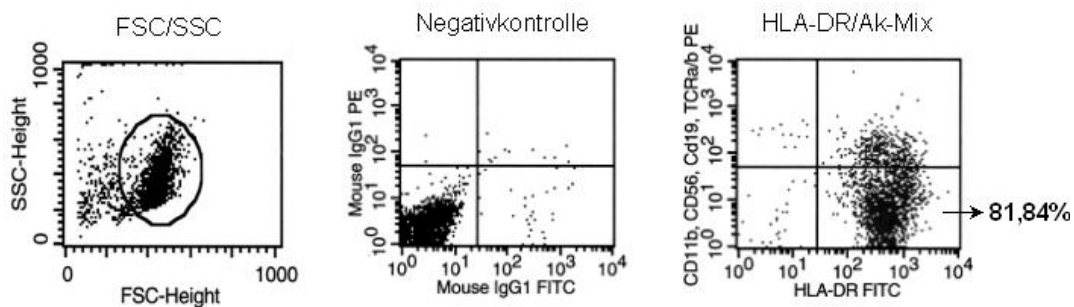


Abbildung 4.15: Darstellung der FACS-Analyse von DC aus dem peripheren Blut. In der Mitte ist die Isotypenkontrolle dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Ak-Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der PE-Antikörper-Mix besteht aus CD11b, CD56, CD19, T-Zell Rezeptor a/b.

Tabelle 4.8: Phänotypbestimmung für CD1c-positive DC

Ansatz	FITC-Ak	Spezifität	PE-Ak	Spezifität	PerCP-Ak	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotyp- kontrolle	Maus IgG ₁	Isotyp- kontrolle	Maus IgG ₁	Isotyp- kontrolle
2	Anti-Biotin	Sekundär- Ak gegen BDCA1	CD 14	Monozyten	CD 19	B-Zellen

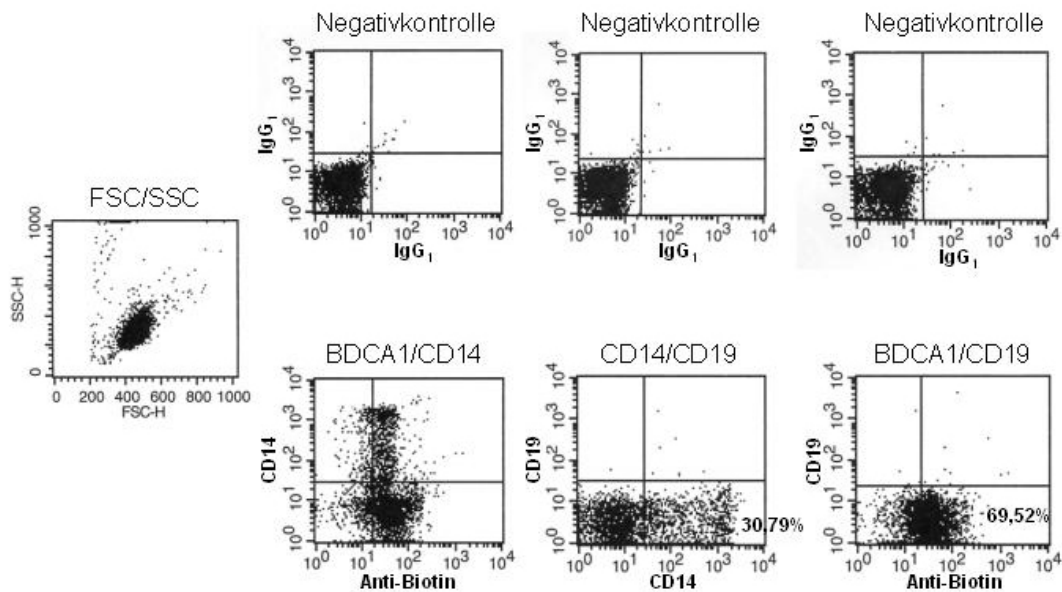


Abbildung 4.16: Darstellung der FACS-Analyse von CD1c-positiven DC. In der oberen Reihe sind die Isotypenkontrollen dargestellt. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Ak-Färbung. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Für BDCA1 wurde über einen Anti-Biotin-FITC sekundär Antikörper gefärbt.

Die verschiedenen aus Spenderblut isolierten DC-Subpopulationen konnten in einer Reinheit von zwischen 70% und 80% gewonnen werden (plasmazytoide DC 79,51%, DC aus dem Blut 81,84%, CD1c-positiv DC 69,52%). Bei den DC aus dem Blut wurde bei der Antikörperfärbung ein PE-Antikörper-Mix aus CD11b, CD56, CD19 und T-Zell Rezeptor a/b gegen HLA-DR FITC-Antikörper verwendet. Alle für den Ak-Mix negativen und für HLA-DR positiven Zellen sind dendritische Zellen.

Für die plasmazytoiden DC ist BDCA2 ein spezifischer Oberflächenmarker gegen welchen direkt mit einem BDCA2-FITC Antikörper gefärbt wurde.

Für die Reinheitskontrolle der CD1c-positiven DC wurde BDCA1 als Marker eingesetzt. Die Färbung erfolgte indirekt über einen Anti-Biotin-FITC Zweitantikörper.

4.7.2 Expression des Gens p275 in verschiedenen Leukozyten Subpopulationen

Die Transkription des Gens p275 wurde in den verschiedenen Leukozyten subpopulation (B- und T-Lymphozyten, plasmazytoide DC, DC aus dem peripheren Blut, CD1c-positiven DC und aus CD34-positiven Stammzellen generierte DC) mit RT-PCR untersucht. Nach der Isolation der Zellen aus PBMC und der phänotypischen Analyse in der Durchflusszytometrie wurde die RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend die PCR durchgeführt (eingesetzte cDNA Menge 1 μ l pro Ansatz, Ausnahme DC aus CD34-positiven Stammzellen, eingesetzte cDNA Menge 0,5 μ l; siehe Methoden 3.9). Die einzelnen Zellpopulationen wurden aus dem Blut von verschiedenen Spendern isoliert.

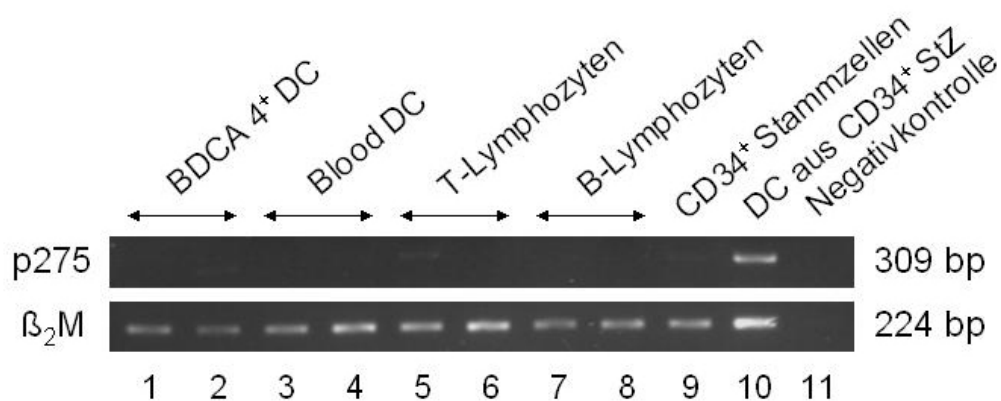


Abbildung 4.17: Darstellung der RT-PCR mit den verschiedenen Leukozyten Subpopulationen. In Spur 1 und 2 sind plasmazytoide DC, in Spur 3 und 4 DC aus dem peripheren Blut, in Spur 5 und 6 T-Lymphozyten, in Spur 7 und 8 B-Lymphozyten, in Spur 9 CD34-positive Stammzellen und in Spur 10 daraus generierte DC zu sehen. Die Negativkontrolle ohne cDNA ist in Spur 11 aufgetragen. Zur Kontrolle wurden Primer gegen β_2 -Mikroglobulin eingesetzt. Als Größenmarker wurde die *1kb-DNA-Ladder* verwendet (nicht abgebildet).

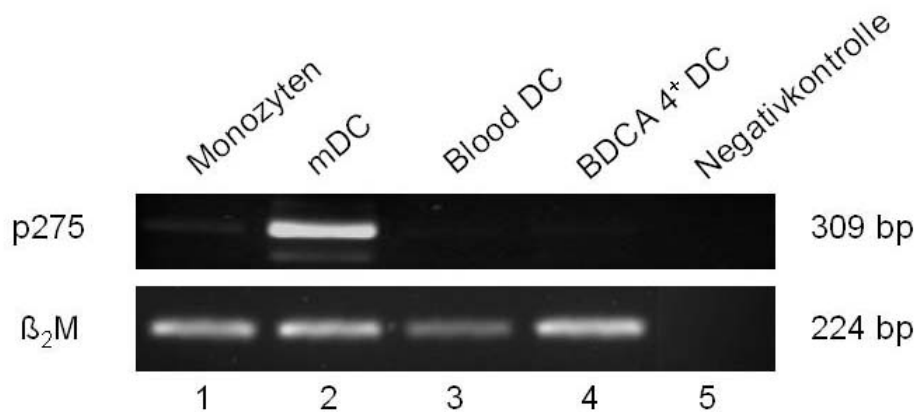


Abbildung 4.18: Darstellung der RT-PCR mit plasmazytoiden DC (Spur 3, 4), DC aus peripherem Blut (Spur 5, 6) und CD1c-positiven DC (Spur 7). In Spur 1 und 2 Monozyten und daraus generierte DC zum Vergleich. Die Negativkontrolle ohne cDNA ist in Spur 8 aufgetragen. Zur Kontrolle wurden Primer gegen β_2 -Mikroglobulin eingesetzt. Als Größenmarker wurde die *1kb-DNA-Ladder* verwendet (nicht abgebildet).

In der RT-PCR Untersuchung der verschiedenen Leukozyten Subpopulationen zeigt sich nur bei den aus CD34-positiv generierten DC (Abbildung 4.17, Spur 10) und den aus Monozyten generierten DC (Abbildung 4.18, Spur 2) ein Signal für das Transkript von p275. In allen weiteren DC Subpopulationen konnte in diesen Versuchen kein Transkript nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden Primer für β_2 -Mikroglobulin eingesetzt. Sie zeigen eine gleichmäßige Signalverteilung.

4.7.3 Expression des Proteins P275 in verschiedenen Leukozyten Subpopulationen

Nach der Untersuchung der verschiedenen Leukozyten Subpopulationen auf DNA-Ebene durch die RT-PCR, wurde die Expression von P275 auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blot untersucht. In den beiden Blots wurden 10 μ g Protein (Abb. 4.19) bzw. 10 μ g Protein pro Spur (Abb. 4.20) geladen. Die verwendeten Zellen stammen aus dem Blut verschiedener Spender. Jede Leukozyten Subpopulation wurde anhand mehrerer Spender auf die Expression von P275 hin analysiert. Zur Kontrolle und als Vergleich wurden jeweils Proteinlysate von Monozyten und mDC auf den Blots mituntersucht.

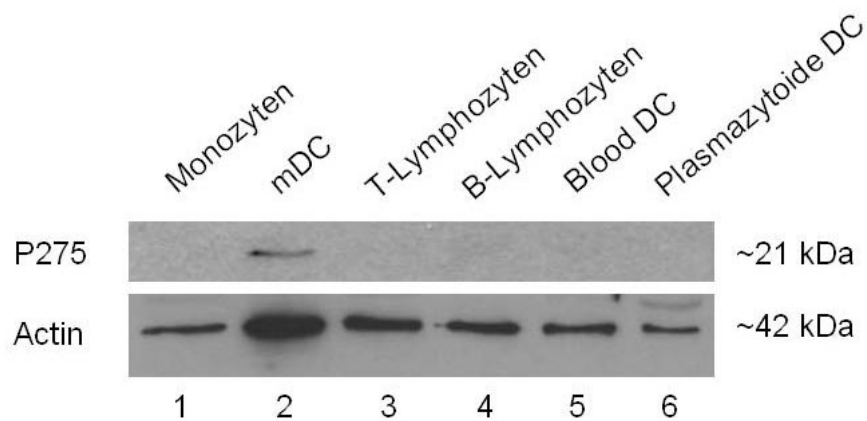


Abbildung 4.19: Darstellung des Western Blots mit den verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen. Spur 1 zeigt nicht stimulierte Monozyten, Spur 2 die daraus generierten DC. In Spur 3 und 4 sind T- und B-Lymphozyten, in Spur 5 und 6 DC aus dem Blut und plasmazytoide DC zu sehen. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Actin eingesetzt. Als Größenmarker diente der biotinylierte *LowRange*-Marker (nicht abgebildet).

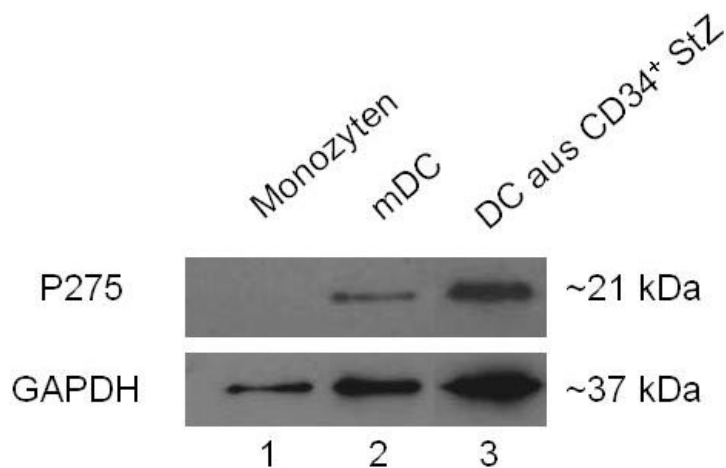


Abbildung 4.20: Darstellung des Western Blots mit Monozyten (Spur 1), aus diesen generierten DC (mDC) (Spur 2) und aus CD34-positiven Stammzellen generierten DC (Spur 3). Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Actin eingesetzt. Als Größenmarker diente der biotinylierte *LowRange*-Marker (nicht abgebildet).

In dem in Abbildung 4.19 dargestellten Western Blot sind außer bei den aus Monozyten generierten DC keine Proteinbanden in den DC Subpopulationen zu sehen. In Abbildung 4.20 ist ein Signal bei ebenfalls den mDC und den aus CD34-positiven Stammzellen generierten DC zu erkennen. Diese Western Blot Ergebnisse bestätigen die bereits in der RT-PCR gewonnenen Erkenntnisse, d.h. bei den Zellen, bei denen ein Transkript für p275 vorhanden war, konnte das Protein P275 auch nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des gesamten Immunsystems. Sie sind in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren und nehmen eine zentrale Rolle in der Antigenerkennung und der Induktion einer spezifischen Immunantwort ein [Steinmann et al, 1998, Cella et al., 1997, Banchereau et al., 2000].

Lange Zeit war es schwierig, DC in ausreichender Zahl für Untersuchungen zu gewinnen, da sie nur zu einem kleinen Teil im peripheren Blut vorliegen. Vor einigen Jahren wurden jedoch Verfahren entwickelt, die es ermöglichen, DC *in vitro* in größerer Zahl aus CD14-positiven Monozyten oder CD34-positiven Stammzellen herzustellen [Chapius et al., 1997, Young et al., 1995, Caux et al. 1997]. Dies ermöglichte auch zunehmend den Einsatz von DC in klinischen Studien zur Behandlung von Tumor- bzw. Infektionserkrankungen [Bubenik et al. 2001, Brossart et al. 2001, Cerundolo et al. 2004, Figdor et al. 2004, Morse et al. 1997, Morse et al. 2003].

Für ihre Aufgaben und die Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems besitzen DC verschiedene differentiell exprimierte Proteine. Mit Hilfe der cDNA-Subtraktion ist es möglich, solche bisher noch nicht bekannten Proteine zu identifizieren und durch die Methode der RT-PCR als auch durch die Methode des Western Blots die differentielle Expression auf DNA- und Proteinebene zu überprüfen [Grünebach et al. 2002]. Die Erforschung neuer Proteine ermöglicht die weitere Charakterisierung und Aufklärung ihrer immunbiologischen Funktion.

In der vorliegenden Arbeit wird das zuvor durch cDNA Subtraktion identifizierte bisher nicht beschriebene Protein P275 und seine differentielle Expression in DC näher charakterisiert.

5.1 Spezifität des eingesetzten Antikörpers für P275

Zunächst musste der durch die Immunisierung von zwei Kaninchen gewonnene, von der Firma Pineda Antikörperservice hergestellte, polyklonale Antikörper gegen das Protein P275 daraufhin überprüft werden, ob er das

Protein spezifisch erkennt. Dafür wurde ein Peptidblockversuch durchgeführt bei dem durch einen Vergleich von regulärer Antikörperlösung und einem Gemisch aus Antikörper und dem Vakzinierungspeptid gezeigt werden sollte, dass die entsprechenden Antikörpersignale im Western Blot für das untersuchte Protein P275 spezifisch sind (siehe 4.1).

In dem Versuch kam es zu einem völligen Verschwinden der Antikörperbanden in dem Ansatz mit den durch das Vakzinierungspeptid geblockten Antikörpern. Dies beweist, dass die eingesetzten Antikörper in der Lage sind, das Protein P275 spezifisch zu detektieren. Neben dem Antikörpersignal bei einem MG von 21 kDa liegen zwei weitere deutlich schwerere Ak-Banden vor. Auch diese zwei Banden werden von dem Antikörper gegen P275 spezifisch erkannt, da sie in der peptidgeblockten Ak-Lösung nicht auftauchen. Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um den N-System Aminosäuretransporter NAT-1 (51 kDa), der dem Protein P275 sehr ähnlich ist und somit ebenfalls von dem Antikörper erkannt wird. Dies wird von der Tatsache unterstützt, dass ein Teil der Vakzinierungspeptidsequenz auch in der Aminosäuresequenz des Transporters NAT-1 enthalten ist.

5.2 Differentielle Expression von P275 in DC, den verschiedenen DC Subpopulationen und Lymphozyten

Die differentielle Expression von P275 bzw. des Gens AF070578 wurden mit Western Blot und RT-PCR untersucht.

Zunächst sollte die mit der cDNA-Subtraktion gewonnene Annahme über die differentielle Expression in DC im Vergleich zu den Monozyten als Vorläuferzellen bestätigt werden. In beiden Versuchen (4.2.2 und 4.2.3) konnte dies sehr klar gezeigt werden, d.h. in den *in vitro* aus Monozyten generierten DC (mDC) wurde p275 und sein Transkript nachgewiesen, nicht jedoch in den jeweiligen Monozyten aus denen sie hervorgegangen waren. Damit kann festgestellt werden, dass P275 in den mDC differentiell exprimiert wird.

Weitere Versuche wurden unternommen, um die Expression von P275 in den verschiedenen DC-Subpopulationen (siehe 1.2.1.1) näher zu untersuchen. Hierzu wurden plasmazytoide DC, DC aus dem peripheren Blut, aus CD34⁺-

Progenitoren generierte DC, sowie CD1c-positive DC für die Untersuchungen verwendet. Neben den mDC konnte das Vorhandensein von P275 bzw. AF070578 nur in den aus CD34-positiven Progenitor Zellen generierte DC eindeutig gezeigt werden (4.6.2 und 4.6.3). Warum p275 nicht in allen DC Subpopulationen nachgewiesen werden konnte, kann verschiedene Gründe haben. Zum einen ist es denkbar, dass das Protein P275 ganz spezifisch nur in bestimmten Untergruppen der DC vorkommt, was z.B funktionelle Gründe im Sinne der unterschiedlichen Aufgaben der einzelnen DC-Subtypen haben kann. Hierbei könnte man zu der Erkenntnis gelangen, dass P275 insbesondere in interstitiellen DC (den mDC sehr ähnlich) nicht jedoch in plasmazytoiden DC, DC aus dem Blut und Langerhans Zellen eine Rolle spielen. Da die DC aus dem Blut noch nicht ihre volle funktionelle Reife erreicht haben, lassen sich Vermutungen anstellen, bei denen P275 erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung eine Rolle spielt bzw. erst nachdem die DC in ein peripheres Gewebe eingewandert sind. Dieser Annahme widerspricht jedoch die Beobachtungen des zeitlichen Verlaufs der Expression bei der Entwicklung aus Monozyten (4.3.1, 4.3.2 und 5.3). Zum anderen ist festzustellen, dass p275 in der vorliegenden Arbeit nur in den *in vitro* generierten DC (mDC, aus CD34-positiv generierte DC) eindeutig nachgewiesen werden konnte, so dass die Annahme nahe liegt, dass hierbei die Kultur einen Einfluss auf die Expression von P275 nimmt. Da es sich bei dem Protein P275 aller Wahrscheinlichkeit nach um eine Variante des Aminosäuretransporters NAT-1/SNAT-6 handelt, ist es möglich, dass die Aufnahme von Aminosäuren im speziellen durch P275 eine besondere Rolle in der *in vitro* Entwicklung von DC spielt. Um jedoch bessere Annahmen und Gründe für die unterschiedliche Expression zu finden, ist eine funktionelle Untersuchung und Charakterisierung von P275 in Zukunft von besonderer Bedeutung.

Neben Monozyten und den verschiedenen DC-Subpopulationen wurden auch B- und T-Lymphozyten auf die Expression von AF070578 und P275 hin untersucht (4.6.2 und 4.6.3). In allen Versuchen (Western Blot und RT-PCR) wurde kein Signal für p275, weder in B- noch in T-Lymphozyten, detektiert. Es lässt sich daher feststellen, dass das Protein P275 innerhalb der Leukozyten

ein differentiell in bestimmten DC exprimiertes Protein ist, das somit zur näheren Charakterisierung der DC herangezogen werden kann.

5.3 Zeitlicher Verlauf der Expression von P275 bei der Entwicklung der DC aus Monozyten

Der zeitliche Verlauf der Expression von p275 bei der Entwicklung von DC aus Monozyten wurde ebenfalls in einer Serie von Versuchen näher beleuchtet. Hierzu wurden sowohl RT-PCR Versuche, als auch Western Blot Analysen durchgeführt (4.3.1 und 4.3.2). Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass bereits nach 4 Stunden ein Transkript des Gens AF070578 vorliegt und schon nach 24 Stunden auch im Western Blot das Protein P275 nachgewiesen werden kann. Da es sich bei P275 höchstwahrscheinlich um einen membranständigen Aminosäuretransporter handelt, scheint dieser schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Kultivierung der Monozyten, in der Entwicklung zu DC eine Rolle zu spielen.

5.4 Einfluss der Stimulation von DC bzw. der Inhibition der DC-Entwicklung auf die Expression von P275

DC können durch verschiedene Zytokine [Zou et al., 2002, Jonuleit et al., 1997] und die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren [Medzhitov et al., 1997, Aderem et al., 2000, Chuang et al. 2000, Takeda et al., 2003] stimuliert und aktiviert werden. In Western Blot Versuchen mit unterschiedlichen Spendern wurde der Einfluss der Stimulation/Aktivierung der DC auf die Expression von P275 analysiert (4.4). Dabei konnte kein einheitliches Bild einer Überexpression oder Suppression unter dem Einfluss der einzelnen Stimulantien gewonnen werden. Dies kann Hinweis darauf sein, dass p275 keine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der DC spielt bzw. das mit einer reinen Expressionsanalyse mittels Western Blot eine Regulation von P275 nicht hinreichend genau erfasst und analysiert werden kann.

Die Entwicklung von DC kann durch verschiedene Substanzen wie z.B. Imatinib und IL-10 [Steinbrink et al., 1999, Wirths et al., 2002] oder Troglitazone inhibiert werden.

Imatinib (STI571) ist ein kompetitiver Inhibitor der Bcr-Abl Tyrosinkinase, mit welchem erste erfolgsversprechende Resultate bei der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) erzielt werden konnten. Neben der Inhibition der Bcr-Abl Tyrosinkinase, zeigte es auch eine Aktivität gegen *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R), *c-Kit*, *Abl-related gene* (ARG) und ihre Fusionsproteine. In vitro Experimente haben gezeigt, dass Imatinib das Wachstum von Zelllinien und primitiver maligner Vorläuferzellen der CML, welche das Bcr-Abl Gen exprimieren, blockieren [Appel et al., 2004].

In der Gegenwart von IL-10 entwickeln sich Monozyten nicht zu dendritischen Zellen. Sie exprimieren niedrigere Level des MHC Klasse II Moleküls und keinen CD1a Marker. IL-10 fördert die Entwicklung zu großen Zellen mit der Morphologie, Cytochemie und dem Membranphenotyp von Makrophagen, einschliesslich der Expression von unspezifischer Esterase und hoher Level von CD14, CD16 und CD68 [Allavena et al., 1998].

Troglitazone wurde ursprünglich als sogenannter Insulinsensitizer für die Behandlung des Diabetes mellitus entwickelt, erfuhr jedoch wegen hepatotoxischer Nebenwirkungen keine Markteinführung. Es handelt sich dabei um einen Aktivator des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR- γ . Als dieser beeinflusst er die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen. Dabei wird sowohl die Downregulation von CD14, als auch die Expression des DC-spezifischen CD1a Markers verhindert. Des Weiteren ist eine Hochregulation des costimulatorischen Moleküls CD86 (B7.2), sowie parallel hierzu die Downregulation des CD80 Moleküls (B7.1) zu beobachten [Nencioni et al., 2002].

In vier verschiedenen Western Blot Versuchen (4.5) wurde die Expression von P275 in DC, die durch diese drei Substanzen behandelt wurden, überprüft. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass P275 in den durch IL-10 inhibierten DC nicht exprimiert wird. Die Regulation von P275 wird durch die beiden anderen

Substanzen Imatinib (STI 571, Glivec[®]) und Troglitazone nicht beeinflusst. Da IL-10 die Entwicklung zu DC hemmt, legen diese Resultate nahe, dass p275 eine Rolle in der Funktion von DC spielt. Eine rein kulturbedingte Expression von p275 *in vitro* ist daher unwahrscheinlich.

6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind die effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems und vermitteln viele ihrer immunbiologisch wichtigen Aktivitäten über Oberflächenmoleküle.

Seit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms vor wenigen Jahren, ist es mit Hilfe von subtraktiven DNA-Analysen möglich, Gene und durch sie kodierte Proteine zu identifizieren, die auf einem bestimmten Zelltyp differentiell exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Oberflächenprotein P275 und seine differentielle Expression auf DC näher charakterisiert. P275 zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem N-System Aminosäuretransporter NAT-1 (SNAT-6). Es handelt sich bei P275 wahrscheinlich um eine Spleißvariante des NAT-1 Transporters.

Zunächst wurde die Spezifität des für die Western Blot - Analysen eingesetzten polyklonalen Antikörpers für das Protein P275 nachgewiesen. Sowohl auf DNA-Ebene als auch Proteinebene konnte die differentielle Expression von P275 auf monozyten-generierten DC gezeigt werden. Eine durchgeführte Kinetik-Untersuchung über den Zeitpunkt der Expression zeigte, dass die Transkription von p275 und folglich auch die Expression des Proteins P275 zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der DC aus Monozyten stattfindet.

Eine Aktivierung der DC durch verschiedene Stimulanzen hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Expression in den DC. Die Hemmung der DC-Entwicklung durch IL-10 führte im Gegensatz dazu zu einer Inhibition der Expression des Proteins P275.

Durch weitere RT-PCR- und Western Blot-Versuche konnte gezeigt werden, dass das Gen AF070578 und sein Protein P275 neben aus Monozyten-generierten DC auch in aus CD34-positiven Stammzellen hergestellten DC vorhanden sind. Auf B- und T-Lymphozyten wird P275 hingegen nicht exprimiert.

Das Protein P275 ist damit ein innerhalb der Leukozyten in bestimmten DC differentiell exprimiertes Protein, das zur näheren Charakterisierung der DC herangezogen werden kann.

Abkürzungsverzeichnis

A	a	Adenosin
	Ak	Antikörper
	APC	<i>Antigen presenting cell(s)</i> (Antigen-präsentierende Zellen)
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	ATP	Adenosintriphosphat
	BCA	Bicinchoninsäure
B	BDCA	<i>Blood Dendritic Cell Antigen</i>
	β_2 M	β_2 -Mikroglobulin
	bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
	BSA	Bovines Serumalbumin
C	CD	<i>Cluster(s) of differentiation</i>
	CD40L	CD40-Ligand
	cDNA	<i>complementary</i> bzw. <i>copy</i> DNA
	c	Cytosin
	CK	Chemokin
	CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte(s)</i> (zytotoxische T-Lymphozyten)
	CML	Chronisch myeloische Leukämie
D	DC	Dendritic Cell(s) (dendritische Zellen)
	ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DTT	1,4-Dithiothreitol
E	ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
	EST	<i>Expressed sequence tag</i>
	et al.	<i>et alii</i>

F	FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
	FCS	Fetales Kälberserum
	FSC	<i>Forward scatter</i>
	fsp	<i>full speed</i> (maximale Geschwindigkeit)
	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
	FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3
G	g	Guanosin
	GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
	GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>
	GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
H	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
	HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (menschliches Leukozytenantigen)
	hnRNA	<i>heteronuclear RNA</i>
	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
I	IFN	Interferon
	Ig	Immunglobulin
	IL	Interleukin
K	kb	Kilobasenpaare
	kDa	kiloDalton
L	LC	Langerhans-Zellen
	LPS	Lipopolysaccharid
M	M	Molar (mol/l)
	MACS	<i>Magnetic-associated cell sorting</i>
	M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
	mDC	<i>monocytederived DC</i>
	MG	Molekulargewicht
	MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I
	MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen

	NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
P	Pam ₃ Cys	<i>N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine</i>
	PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
	PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
	PenStrep	Penicillin + Streptomycin
	PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
	PE	Phycoerythrin
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	Poly I:C	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
	PPAR _γ	<i>Peroxisom Proliferator Activated Receptor γ</i>
R	RIPA	Radioimmun-Präzipitations-Assay
	RNA	Ribonukleinsäure
	rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
	RPMI	Roswell Park Memorial Institut: 1640-Zellkulturmedium
	RT	Raumtemperatur
	RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-PCR</i>
S	SDS	<i>Sodiumdodecylsulphate</i>
	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	SFL	SlimFast-Lösung
	SLC	Solute carrier
	snRNA	small nuclear RNA
	SSC	<i>Side scatter</i>
T	T	Temperatur
	t	Thymidin
	TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
	TBST	<i>Tris buffered saline with Tween-20</i>

TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGZ	Troglitazone
T _H 1	T-Helfer-Zellen-1
T _H 2	T-Helfer-Zellen-2
TLR	<i>Toll like receptor</i> (Toll ähnliche Rezeptoren)
TLRL	<i>Toll like receptor ligand</i>
TNF	Tumornekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	<i>Unit</i> (Einheit)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Darstellung dendritischer Zellen	4
Abbildung 1.2:	Darstellung der verschiedenen DC Subtypen und ihrer Oberflächenmarker	6
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese	12
Abbildung 1.4:	Darstellung der cDNA-Sequenz des Gens AF070578.....	15
Abbildung 1.5:	Darstellung der Aminosäuresequenz des Proteins P275	16
Abbildung 1.6:	Vergleich der Aminosäuresequenz des N-System Aminosäuretransporters NAT-1 und des Proteins P275.....	17
Abbildung 1.7:	Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur für P275.....	17
Abbildung 3.1:	Anordnung des Blottingsystems	45
Abbildung 4.1:	Phänotypisierung von aus Monozyten generierten DC.....	49
Abbildung 4.2:	Darstellung der RT-PCR für die differentielle Transkription des Gen p275	50
Abbildung 4.3:	Darstellung des Western Blots mit dem gegen P275 gerichteten Antikörper	51
Abbildung 4.4:	Darstellung des Western Blot für die differentielle Expression des Protein P275.	52
Abbildung 4.5:	Darstellung der 148 h RT-PCR Kinetik	53
Abbildung 4.6:	Darstellung der 24 h RT-PCR Kinetik	54
Abbildung 4.7:	Darstellung der Western Blot-Kinetik.....	55
Abbildung 4.8:	Darstellung des Western Blots mit stimulierten DC	56
Abbildung 4.9:	Darstellung des Western Blots mit entwicklungsgehemmten DC	57
Abbildung 4.10:	Darstellung der FACS-Analyse von Monozyten.....	59
Abbildung 4.11:	Darstellung der FACS-Analyse von T-Lymphozyten	60
Abbildung 4.12:	Darstellung der FACS-Analyse von B-Lymphozyten	61
Abbildung 4.13:	Darstellung der FACS-Analyse von aus CD34-positiven Stammzellen generierten DC.....	62
Abbildung 4.14:	Darstellung der FACS-Analyse von plasmazytoiden DC	63
Abbildung 4.15:	Darstellung der FACS-Analyse von DC aus dem peripheren Blut	64

Abbildung 4.16: Darstellung der FACS-Analyse von CD1c-positiven DC.....	65
Abbildung 4.17: Darstellung der RT-PCR mit den verschiedenen Leukozyten Subpopulationen	66
Abbildung 4.18: Darstellung der RT-PCR mit plasmazytoiden DC, DC aus peripherem Blut und CD1c-positiven DC	67
Abbildung 4.19: Darstellung des Western Blots mit den verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen	68
Abbildung 4.20: Darstellung des Western Blots mit Monozyten, aus diesen generierten DC (mDC) und aus CD34-positiven Stamm- zellen generierten DC.....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Auswahl verschiedener Zytokine	11
Tabelle 2.1: Geräte	21
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial	23
Tabelle 2.3: Antikörper	25
Tabelle 2.4: Chemikalien	26
Tabelle 2.5: <i>Toll-like-receptor</i> Liganden	28
Tabelle 2.6: Kits	28
Tabelle 2.7: Medien	29
Tabelle 2.8: Zytokine	30
Tabelle 2.9: Puffer	30
Tabelle 3.1: Stimulatoren und Inhibitoren der DC-Differenzierung.	35
Tabelle 3.2: Zusammensetzung des cDNA- <i>Mastermix</i>	39
Tabelle 3.3: Zusammensetzung des PCR- <i>Mastermix</i>	40
Tabelle 3.4: PCR-Programm für Primer AF070578 F+R	41
Tabelle 3.5: PCR-Programm für GAPDH-Primer.....	41
Tabelle 3.6: Zusammensetzung Trenngel (15% Acrylamid), SDS-PAGE.....	44
Tabelle 3.7: Zusammensetzung Sammelgel, SDS-PAGE	44
Tabelle 4.1: Phänotypbestimmung für aus Monozyten generierte DC.....	48
Tabelle 4.2: Phänotypbestimmung für Monozyten.....	59
Tabelle 4.3: Phänotypbestimmung für T-Lymphozyten	60
Tabelle 4.4: Phänotypbestimmung für B-Lymphozyten	61
Tabelle 4.5: Phänotypbestimmung für aus CD34-positiven Stammzellen generierte DC.....	62
Tabelle 4.6: Phänotypbestimmung für plasmazytoide DC	63
Tabelle 4.7: Phänotypbestimmung für DC aus peripherem Blut.....	64
Tabelle 4.8: Phänotypbestimmung für CD1c-positive DC.....	64

Literaturverzeichnis

Aderem A, Ulevitch RJ (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*; **406**(6797):782-7.

Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*; **28**: 359-69.

Appel S, Boehmler AM, Grünebach F, Müller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brümendorf TH, Brossart P (2004). Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood*; **103**(5): 1966-67.

Appel S, Bringmann A, Grunebach F, Weck MM, Bauer J, Brossart P (2006). Epithelial specific transcription factor ESE-3 is involved in the development of monocyte derived DC. *Blood*; **107**(8):3265-70.

Armstrong CM (2003). Voltage-gated K channels. *Sci STKE*; **2003**(188):re10.

Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, Martelli V, Stanzani M, Falcioni S, Bonifazi F, Bandini G, Tura S, Baccarani M, Rondelli D (2002). Use of anti-BDCA-2 antibody for detection of dendritic cells type-2 (DC2) in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*; **29**(11):887-91.

Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*; **392**(6673):245-52.

Bancherau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*; **18**:767-811.

Banerjee AK (1980). 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev*; **44**(2):175-205.

Birnstiel ML, Busslinger M, Strub K (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell*; **41**(2):349-359.

Brenner S, Jacob F, Meselson M (1960). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*; **190**:576-581.

Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L (2001). Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol*; **29**(11):1247-1255.

Borst P, Elferink RO (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*; **71**:537-92.

Bubenik J (2001). Genetically engineered dendritic cell-based cancer vaccines. *Int J Oncol*; **18**(3):475-478.

Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes (1994). *J Immunol*.; **152**(4):1523-1531.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J (1997). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood*; **90**(4):1458-70.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*; **180**(4): 1263-1272.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*; **9**(1):10-16.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*; **5**(8):919-23.

Cerundolo V, Hermans IF, Salio M (2004). Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol*; **5**(1):7-10.

Chapius F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol*; **27**(2):431-41.

Chuang TH, Ulevitch RJ (2000). Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw*; **11**(3):372-8.

Clark MR (1997). IgG effector mechanisms. *Chem Immunol*; **65**:88-110.

Coico RF, Bhogal BS, Thorbecke GJ (1983). Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol*; **131**(5):2254-7.

Crick FH (1966). The genetic code. *Sci Am*; **215**(4):55-60.

- Crick FH. Central dogma of molecular biology (1970). *Nature*; **227**(5258):561-563.
- Croft M, Swain SL (1991). B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J Immunol.*; **146**(12):4055-64.
- Darnell JE Jr (1983). The processing of RNA. *Sci Am*; **249**(4):90-100.
- DeCoursey TE, Morgan D, Cherny VV (2002). Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol Rev*; **83**(2):475-579.
- Delves PJ, Roitt IM (2000). The immune system. *N Engl J Med*; **343** (1): 37-49; **343** (2): 108-117.
- Dunbar LA, Caplan MJ (2000). The cell biology of ion pumps: sorting and regulation. *Eur J Cell Biol*; **79**(8):557-63.
- Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*; **165**(11):6037-46
- Dzionic A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Günther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*; **194**(12):1823-34.
- Edwards SW (1994). Biochemistry and physiology of the neutrophil. Edited by Edwards SW. Cambridge, *Cambridge University Press*.
- Elder JT, Reynolds NJ, cooper KD, Griffiths CE, Hardas BD, Bleicher PA (1993). CD1 gene expression in human skin. *J Dermatol Sci*; **6**(3):206-13.
- Facchetti F, Candagio E, Vermi W (1999). Plasmacytoid monocytes express IL3-receptor alpha and differentiate into dendritic cells. *Histopathology*; **35**(1):88-9.
- Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med*; **10**(5):475-480.
- Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science*; **251**(4991):313-316.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (2001). *Kuby Immunology*, 4.Auflage, W.H. Freeman and Company, New York.

Grunebach F, Weck MM, Reichert J, Brossart P (2002). Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol*; **30**(11):1309-15.

Guthrie C, Patterson B (1988). Spliceosomal snRNAs.. *Annu Rev Genet*; **22**:387-419.

Hart DN, Febre JW (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med*; **154**(2):347-61.

Hart DN (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*; **90**(9):3245-87.

Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2003). The ABC of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch – Eur J Physiol*; **447**:465-468.

Humphrey T, Proudfoot NJ (1988). A beginning to the biochemistry of polyadenylation. *Trends Genet*; **4**:223-245.

Jacob F, Monod J (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*; **3**:318-356.

Janeway CA, Rosen FS, Merler E, Alper CA (1967). *The Gamma Globulins*. 2.Auflage, Boston, Little, Brown and Co.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002). *Immunologie*, 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*; **423**(6935):42-8.

Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1996). Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*; **289**(1):1-8.

Keller R (2001). Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol Lett*; **78**(3):113-22.

Knight SC, Balfour BM, O'Brien J, Buttifant L, Summerska T, Clarke J (1982). Role of veiled cells in lymphocyte activation. *Eur J Immunol*; **12**(12):1057-60.

Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D (1992). Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol.*; **22**(10):2573-8.

Lang F (2000). Basiswissen Physiologie, 1. Auflage, *Springer Verlag Berlin*; 138-148.

Langerhans, P (1868). Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch*; **44**:325-327

Lanzavecchia A (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol.*; **8**:773-777.

Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM (1990). Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med*; **172**(5):1483-93.

Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC (1992). Functional expression of the costimulatory molecule B7/BB1 on murine dendritic cell populations. *J Exp Med*; **176**(4):1215-1220.

Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L (1999). Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation*; **23**(3):217-30.

Libscomb MF, Masten BJ (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*; **82**(1):97-130.

Mackenzie B, Erickson JD (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch – Eur J Physiol*; **447**:784-795.

Maniatis T, Reed R (1987). The role of small ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature*; **325**:673-678.

Matzinger P, Guerder S (1989). Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature*; **338**(6210):74-6.

Mazzarella G, Petillo O, Margarucci S, Calabrese C, Peluso G (1998). Role of monocyte/macrophage population in immune response. *Monaldi Arch Chest Dis.*; **53**(1):92-6.

McEwen BJ (1992). Eosinophils: a review, *Vet Res Commun*; **16**(1):11-44.

McLellan AD, Sorg RV, Williams LA (1996). Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40:CD40 ligand-dependant pathway. *Eur J Immunol.*; **26**:1204-1211.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*; **388**(6640):394-7.

Morse MA, Zhou LJ, Tedder TF, Lyerly HK, Smith C (1997). Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha for use in cancer immunotherapy. *Ann Surg*; **226**(1):6-16.

Morse MA, Nair SK, Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Deng Y, Boczkowski D, Proia A, Neidzwiecki D, Clavien PA, Hurwitz HI, Schlom J, Gilboa E, Lyerly HK (2003). Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest*; **21**(3):341-349.

Muller V, Gruber G (2003). ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol Life Sci*; **60**(3):474-94.

Nencioni A, Grunebach F, Zobywlski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P (2002). Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol*; **169**(3):1228-35.

Nirenberg M, Leder P (1964). RNA code words and protein synthesis. *Science*; **145**:1399-1407.

Parker DC (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol.*; **11**:331-60.

Peiser M, Grutzkau A, Wanner R, Kolde G (2003). CD1a and CD1c cell sorting yields a homogeneous population of immature human Langerhans cells. *J Immunol Methods*; **279**(1-2):41-53.

Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stäckl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W (1996). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol*; **157**(9):3850-9.

Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN (1988). Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation*; **46**(5):754-61.

Sallusto F, Lanzavecchia A (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*; **179**:1109-1118.

- Saraya K, Reid CDL (1996). Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ progenitors in bone marrow and cord blood. *Br J Haematol*; **93**(2):258-64.
- Scapini R, Lapient-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*; **177**:195-203.
- Schimmel PR (1987). Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Ann Rev Biochem*; **56**: 125-158.
- Schwartz RH (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*; **248**:1349-1353.
- Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors (1987). *Science*; **235**:766-771.
- Shortman K, Liu YJ (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*; **2**(3):151-61.
- Siebert PD, Chenick A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res*; **23**(6):1087-8.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*; **284**(5421):1835-7.
- Spry CJ, Pflug AJ, Janossy G, Humphrey JH (1980). Large mononuclear (veiled) cells like 'Ia-like' membrane antigens in human afferent lymph. *Clin Exp Immunol*; **39**(3):750-5.
- Spry CJF (1988). Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature. Oxford: Oxford University Press.
- Stavenger J (1996). Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol*; **8**(2):199-205.
- Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*; **93**: 1634-42.
- Steinman RM, Cohn ZA (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*; **137**:1142-1147.

Steinman RM, Young JW (1991). Signals arising from antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol.*; **3**(3):361-72.

Strobl H, Scheinecker C, Riedl E, Csmarits B, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Majdic O, Knapp W (1998). Identification of CD68⁺lin⁻ peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol*; **161**(2):740-8.

Svanborg C, Godaly G, Hedlund M (1999). Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol*; **2**(1):99-105.

Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*; **21**:335-76.

Valle A, Zuber CE, Defrance T, Djossou O, De Rie M, Banchereau J (1989) Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4. *Eur J Immunol.*; **19**(8):1463-7.

Ward ES, Ghetie V (1995). The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Ther Immunol*; **2**(2):77-94.

Wirhth S, Reichert J, Grunebach F, Brossart P (2002). Activated CD8⁺ T lymphocytes induce differentiation of monocytes to dendritic cells and restore the stimulatory capacity of interleukin 10-treated antigen-presenting cells. *Cancer Res*; **62**(17):5065-8.

[www.cbs.dtu.dk/ services/TMHMM-2.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0)

www.clontech.com

www.expasy.org

www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/

www.hgmp.mrc.ac.uk

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.pharmaconference.org/slctable.asp

Ye Z, Gee AP, Bowers WE, Lamb LS, Turner MW, Henslee-Downey PJ (1996). In vitro expansion and characterization of dendritic cells derived from human bone marrow CD34⁺ cells. *Bone Marrow Transplant*; **18**(5):997-1008.

Young JW, Koulova L, Soergel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B (1992). The B7/BB-1 antigen provides one of several co-stimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood DC in vitro. *J Clin Invest.*; **90**:229-237.

Young JW, Szabolcs P, Moore MA (1995). Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*; **182**(4):1111-9.

Yu FH, Catterall WA (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*; **4**(3):207.

Zou GM, Tam YK (2002). Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw*, **13**(2):186-99.

Danksagung

Danken möchte ich ...

... Prof. Dr. med. Peter Brossart für die Überlassung dieses Themas, die Ermöglichung dieser Arbeit, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die kompetente Betreuung.

... Dr. rer. nat. Silke Appel für die ausgezeichnete Anleitung, die sehr kompetente wissenschaftliche Betreuung, ihre Hilfe und stets konstruktive Kritik.

... Dr. rer. nat. Markus Weck für die hervorragende Einarbeitung in die verwendeten Methoden, die Beantwortung aller Fragen und die Aufmunterung während der praktischen Phase dieser Arbeit.

... Dipl. biochem. Anita Bringmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die gute Zusammenarbeit im Labor.

... der gesamten AG Brossart für das angenehme Arbeitsumfeld und die tatkräftigen Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor.

... meinem Kommilitonen und Freund Ingo Hilgendorf für die exzellente Zusammenarbeit, die flexible Vertretung, den Spaß und seine Freundschaft.

... meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und ihr Verständnis und dafür, dass sie mich zu dem gemacht haben, was ich jetzt bin.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Kurz
Geburtstag: 22.01.1980
Geburtsort: Stuttgart

Schulbildung

1986 - 1990 Grundschule St.Bernhardt in Esslingen
1990 - 1999 Schelztorgymnasium Esslingen
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Auslandsaufenthalt

1996 6-monatiger Schüleraustausch in Sheboygan, USA

Zivildienst

1999 - 2000 Zivildienst beim DRK Kreisverband Esslingen
Tätigkeit im Rettungsdienst

Hochschulbildung

2000 - 2007 Eberhardt Karls Universität Tübingen
Studium der Humanmedizin
2002 Ärztliche Vorprüfung
2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/2005 – 06/2005 Brown University Medical School in Providence,
Rhode Island, USA
6-monatiges Auslandsstudium, klinische Kurse in
Pädiatrie, Innere Medizin und Notfallmedizin
2006 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.05.2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

03/2003	Innere Notaufnahme, Klinikum Esslingen
09/2003	Allgemeinchirurgie, U.S. Army Hospital Heidelberg
09/2004	Pädiatrie, Universitätskinderklinik Giessen

Praktisches Jahr

04/2006 - 08/2006	Pädiatrie, Olgahospital in Stuttgart
08/2006 - 12/2006	Chirurgie, Kantonspital Baden, Schweiz
12/2006 - 04/2007	Innere Medizin, Bürgerhospital in Stuttgart

Promotion

2003 - 2007	Doktorarbeit bei Prof. Dr. Peter Brossart, Arbeitsgruppe experimentelle Immuntherapie, Medizinische Universitätsklinik II, Tübingen
-------------	---

Stipendien

Seit 10/2003	Studienstiftung des deutschen Volkes
2003 - 2006	Mitglied im Graduiertenkolleg: „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“
2005	Auslandsstipendium des DAAD