

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. T. Göbel

**Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung
neuer „Chicken Ig-like“ Rezeptoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von

Birgit Viertlböck

aus Landshut

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

1. Referent: Univ.-Prof. Dr. T. Göbel

2. Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Ammer

2. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Allgemeine Charakteristika der Ig-like Rezeptoren.....	2
2.1.1	Extrazytoplasmatischer Bereich	2
2.1.2	Transmembraner und zytoplasmatischer Bereich mit Signaltransduktion	3
2.1.2.1	Inhibitorische Rezeptoren.....	3
2.1.2.2	Aktivierende Rezeptoren	3
2.2	Leukozyten Rezeptor Kluster.....	4
2.2.1	KIR	5
2.2.1.1	Funktion.....	5
2.2.1.2	Struktur und Nomenklatur	6
2.2.1.3	Signaltransduktion	7
2.2.1.4	Genomische Organisation	8
2.2.1.5	Polymorphismus der KIR Gene.....	9
2.2.1.6	Phylogense der KIR Gene	10
2.2.2	ILT	11
2.2.2.1	Struktur und Signaltransduktion.....	11
2.2.2.2	Expression	12
2.2.2.3	Liganden und Funktion.....	12
2.2.2.4	Genomische Organisation	13
2.2.2.5	Polymorphismus und Phylogense der ILT Gene	13
2.2.3	PIR	14
2.2.3.1	Struktur und Signaltransduktion.....	14
2.2.3.2	Expression, Liganden und Funktion.....	14
2.2.4	Weitere Ig-like Rezeptoren im LRC.....	15
2.2.4.1	LAIR.....	15
2.2.4.2	Fc α R.....	15
2.2.4.3	NKp46	15
2.2.4.4	GPVI.....	15
2.3	Ig-like Rezeptoren in anderen Spezies.....	16
2.3.1	Rind.....	16
2.3.2	Fisch.....	16
2.3.3	Huhn	17
3	Zielsetzung der Arbeit	18
4	Material und Methoden	19
4.1	Tiere und Tierhaltung.....	19
4.1.1	Hühner	19
4.1.2	Mäuse.....	19
4.2	Präparation von primären Hühnerleukozyten	19
4.2.1	Material.....	19
4.2.2	Durchführung.....	20
4.3	Kultivierung von Zellen	22
4.3.1	Zellkulturmedien und Zusätze	22
4.3.2	Stimulation von primären Leukozyten	24

4.3.2.1	Herstellung von unstimulierten und stimulierten Makrophagen	24
4.3.2.2	Herstellung von ConA stimulierten Leukozyten (Blasten)	24
4.3.3	Zelllinien	25
4.3.4	Zellen einfrieren	25
4.3.5	Zellen auftauen	25
4.3.6	Zellen kultivieren	26
4.4	DNA-Präparation	26
4.5	RNA-Präparation	26
4.5.1	Material	26
4.5.2	Durchführung	27
4.6	RT-PCR	27
4.6.1	cDNA Synthese durch reverse Transkription (RT)	27
4.6.2	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	28
4.6.2.1	Material	28
4.6.2.2	Durchführung	29
4.7	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	30
4.7.1	Material und Durchführung	30
4.8	Agarosegelelektrophorese	30
4.8.1	Material	31
4.8.2	Durchführung	31
4.9	TA-Klonierung und Plasmidaufreinigung	32
4.9.1	Material	32
4.9.2	Durchführung	32
4.10	DNA-Sequenzierung	33
4.11	Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung	33
4.11.1	Durchführung	34
4.12	Ligation	34
4.12.1	Vorbereitung	34
4.12.2	Material	35
4.12.3	Durchführung	36
4.13	Transfektion von eukaryotischen Zellen	36
4.13.1	Transiente Transfektion von 293T-Zellen	36
4.13.1.1	Material	36
4.13.1.2	Durchführung	36
4.13.2	Stabile Transfektion von 2D8-Zellen	37
4.13.2.1	Material	37
4.13.2.2	Transfektion	37
4.13.2.3	Stabile Selektion	38
4.13.3	Stabile Transfektion von HD11-Zellen	38
4.13.3.1	Material	38
4.13.3.2	Durchführung	38
4.14	Northern Blot	38
4.14.1	Elektrophorese und Transfer der RNA auf Nylonmembran	38
4.14.1.1	Material	39
4.14.1.2	Durchführung	40
4.14.2	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde	41
4.14.2.1	Material	41
4.14.2.2	Durchführung	42
4.14.3	Hybridisierung	42
4.14.3.1	Material	42
4.14.3.2	Durchführung	43

4.15 Durchflusszytometrie	43
4.15.1 Material	43
4.15.2 Durchführung	44
4.16 Herstellung monoklonaler Antikörper	45
4.16.1 Immunisierung	45
4.16.2 Fusion	45
4.16.2.1 Material	46
4.16.2.2 Durchführung	46
4.16.3 Selektion auf spezifische Hybridome (sog. Screening)	46
4.16.4 Isotypenbestimmung	47
4.16.5 Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von IgG	47
4.16.5.1 Material	47
4.16.5.2 Durchführung	48
4.17 ELISA	49
4.17.1 Material	49
4.17.2 Durchführung	50
4.18 Oberflächenbiotinylierung von Zellen	50
4.18.1 Material	51
4.18.2 Durchführung	52
4.19 Zellyse	52
4.19.1 Material	52
4.19.2 Durchführung	53
4.20 Immunpräzipitation	53
4.20.1 Material	53
4.20.2 Durchführung	54
4.21 Deglykosylierung von Proteinen	55
4.21.1 Material	55
4.21.2 Durchführung	55
4.22 Western Blot	56
4.22.1 SDS-PAGE	56
4.22.1.1 Material	56
4.22.1.2 Durchführung	57
4.22.2 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (Semi-Dry-Elektroblotting)	58
4.22.2.1 Material	58
4.22.2.2 Durchführung	59
4.22.3 Proteindetektion durch spezifische Antikörper	59
4.22.3.1 Material	59
4.22.3.2 Durchführung	60
4.23 Pervanadatbehandlung von stabil transfizierten 2D8-Zellen	60
4.23.1 Material	60
4.23.2 Durchführung	61
4.24 Proliferationsassay	61
4.24.1 Material	62
4.24.2 Durchführung	62
4.25 Computerprogramme zur Auswertung von Sequenzen	63
4.25.1 DNASTAR Lasergene Software	63
4.25.2 PSORT II	63
4.25.3 Blastx	63
5 Ergebnisse	64
5.1 Identifizierung von sieben verschiedenen CHIR	64

5.1.1	EST-Datenbankanalyse.....	64
5.1.2	Primersynthese, PCR und Sequenzanalyse von Contig 5, 7 und 8.....	65
5.1.3	Einführung einer neuen Nomenklatur	65
5.1.4	Analyse der AS-Sequenz von Contig 5, 7 und 8	66
5.1.5	Identifizierung eines aktivierenden Rezeptors.....	68
5.1.6	Zusammenfassung und vergleichende Analyse aller CHIR	70
5.1.7	Allgemeine Merkmale der AS-Struktur von CHIR-B, -A und -AB	73
5.2	Genomische Analyse.....	73
5.2.1	Analyse der Exon/Intron Strukturen von CHIR-B2, -A2 und -AB1	74
5.2.2	Analyse der Exon/Intron Übergänge	76
5.2.3	BAC (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)-Analyse	77
5.3	Northern Blot Analyse	78
5.4	RT-PCR Analyse.....	79
5.5	Analyse des Expressionsmusters mit Hilfe der Durchflusszytometrie	80
5.5.1	Herstellung von spezifischen mAk.....	80
5.5.2	Immunphänotypisierungen mit den spezifischen mAk	81
5.5.2.1	Einfachfärbungen	81
5.5.2.2	Doppelfärbungen	82
5.5.3	Zusammenfassung der Immunphänotypisierungen	83
5.6	Bestimmung der Molekulargewichte durch Western Blot Analyse.....	86
5.6.1	Western Blot Analyse von CHIR-B2	86
5.6.1.1	Proteindetektion mit Anti-FLAG-HRP	86
5.6.1.2	Proteindetektion mit SA-HRP.....	87
5.6.2	Western Blot Analyse von CHIR-A2 und CHIR-AB1	88
5.7	Nachweis von phosphorylierten ITIMs und SHP-1 und -2	88
5.8	Wachstumsinhibition von stabil transfizierten 2D8-Zellen	89
5.9	Nachweis der Konformation der huIg-Konstrukte.....	90
6	Diskussion	92
6.1	Zuordnung der identifizierten CHIR zu einer Multigenfamilie.....	92
6.2	Potenziell inhibitorische Rezeptoren CHIR-B.....	92
6.2.1	Analyse der DNA- und AS-Sequenz	92
6.2.2	Eingehende Charakterisierung von CHIR-B2	93
6.2.2.1	Genomische Organisation	93
6.2.2.2	Biochemische Analyse	93
6.2.2.3	Gewebeverteilung.....	93
6.2.2.4	Signaltransduktion.....	94
6.2.2.5	Inhibitorische Wirkungsweise.....	95
6.3	Potenziell aktivierende Rezeptoren CHIR-A.....	95
6.3.1	Analyse der DNA- und AS-Sequenz	95
6.3.2	Eingehende Charakterisierung von CHIR-A2.....	96
6.3.2.1	Genomische Organisation	96
6.3.2.2	Biochemische Analyse	96
6.3.2.3	Gewebeverteilung.....	96
6.4	Potenziell inhibitorische und aktivierende Rezeptoren CHIR-AB	97
6.4.1	Analyse der DNA- und AS-Sequenz	97
6.4.2	KIR2DL4 - einziger CHIR-AB-ähnlicher Rezeptor.....	97
6.4.3	Phylogenetische Bedeutung von CHIR-AB	98
6.4.4	Eingehende Charakterisierung von CHIR-AB1	98
6.4.4.1	Genomische Organisation	98
6.4.4.2	Biochemische Analyse	99

6.4.4.3 Gewebeverteilung.....	99
6.5 CHIR – Homolog zu KIR oder ILT?	100
6.5.1 Zuordnung aufgrund struktureller Gegebenheiten.....	100
6.5.2 Zuordnung aufgrund der genomischen Organisation	100
6.5.3 Zuordnung aufgrund der Gewebeexpression.....	101
6.6 Weiterführende Untersuchungen	101
6.6.1 Nachweis des Adaptormoleküls von CHIR-A2.....	101
6.6.2 Identifizierung der Liganden von CHIR-B2, -A2 und -AB1.....	102
6.6.3 Weiterverwendung eines CHIR-spezifischen BAC Klons	102
7 Zusammenfassung	103
8 Summary	105
9 Literaturverzeichnis	107
Anhang: Bezugsquellen	113
A Verwendete Chemikalien und Reagenzien	113
B Geräte in alphabetischer Reihenfolge	114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Struktureller Aufbau eines inhibitorischen und eines aktivierenden Ig-like Rezeptors	4
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der im LRC kodierenden Ig-like Rezeptoren	5
Abb. 2-3: Darstellung der Funktionsweise der KIR auf NK-Zellen	6
Abb. 2-4: Exon/Intronstruktur der KIR	8
Abb. 2-5: Organisation der Exons, die für die verschiedenen Ig-Domänen der KIR kodieren .	9
Abb. 2-6: Organisation der KIR Gene beim Menschen auf Chromosom 19q13.4	10
Abb. 2-7: Organisation der ILT Gene beim Menschen auf Chromosom 19q13.4.....	13
Abb. 4-1: pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor mit genauer Beschreibung der Multiple Cloning Site.....	33
Abb. 4-2: Modifizierter pcDNA6/V5-His A Vektor	34
Abb. 4-3: Modifizierter pcDNA3.1/V5-His TOPO Vektor	35
Abb. 4-4: Schematische Darstellung des Kapillarblottens	41
Abb. 5-1: Sequenzen aus den EST-Datenbanken wurden mit dem Programm „Seqman™“ in Gruppen (sog. Contigs) zusammengefasst	65
Abb. 5-2: DNA-Karte von CHIR-B2	67
Abb. 5-3: DNA-Karte von CHIR-AB1	68
Abb. 5-4: DNA-Karte von CHIR-A2	69
Abb. 5-5: Vergleichende Analyse der AS-Sequenzen aller inhibitorischen Rezeptoren	71
Abb. 5-6: Vergleichende Analyse der AS-Sequenzen aller aktivierenden Rezeptoren	72
Abb. 5-7: Vergleichende Analyse der AS-Sequenzen von CHIR-AB1 und CHIR-AB2	72
Abb. 5-8: Schematische Darstellung der identifizierten CHIR Typen.....	73
Abb. 5-9: Genomische Analyse von CHIR-B2	74
Abb. 5-10: Darstellung der Exon/Intron Struktur von CHIR-A2.....	75
Abb. 5-11: Genomische Analyse von CHIR-AB1	75
Abb. 5-12: PCR mit CHIR-spezifischen Primern auf BAC Klon 093H17	78
Abb. 5-13: Darstellung der im Northern Blot verwendeten RNAs	78
Abb. 5-14: Ergebnis der Northern Blot Analyse.....	79
Abb. 5-15: RT-PCR zur Gewebeverteilung von CHIR.....	80
Abb. 5-16: Immunphänotypisierungen, die zur Herstellung des mAk 3H7 durchgeführt wurden	81
Abb. 5-17: Darstellung der Anti-CHIR-AB1 (8D12)-positiven Makrophagen und Zelllinien	83

Abb. 5-18: Doppelfärbung mit Anti-CHIR-B2 (3H7)	84
Abb. 5-19: Darstellung der Doppelfärbungen mit Anti-CHIR-AB1 (8D12).....	85
Abb. 5-20: Western Blot von stabil transfizierten 2D8-Zellen	86
Abb. 5-21: Western Blot von oberflächenbiotinilierten stabil transfizierten 2D8-Zellen bzw. Bursa B-Zellen	87
Abb. 5-22: Western Blot von stabil transfizierten HD11-Zellen	88
Abb. 5-23: Western Blot von unterschiedlich lang mit Pervanadat behandelten immunprä- zipitierten 2D8 + CHIR-B2-FLAG Zellen	89
Abb. 5-24: Effekt von Anti-CHIR-B2 mAk (3H7) auf stabil transfizierte 2D8 + CHIR-B2- FLAG Zellen	90
Abb. 5-25: ELISA zum Nachweis der Konformation der huIg-Konstrukte	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Zusammenfassung der identifizierten KIR beim Menschen	7
Tab. 2-2: Zusammenfassung der identifizierten ILT beim Menschen	12
Tab. 4-1: Beschreibung der verwendeten Zelllinien	25
Tab. 4-2: Aufstellung der in der PCR verwendeten Primer	29
Tab. 4-3: Aufstellung der in der 3'RACE-PCR verwendeten Primer	30
Tab. 4-4: Auflistung der für die Herstellung der FLAG-Konstrukte und huIg-Konstrukte verwendeten Primerkombinationen.....	35
Tab. 4-5: Aufstellung der für die Durchflusszytometrie verwendeten primären Antikörper..	44
Tab. 5-1: Die mittels PCR identifizierten CHIR	70
Tab. 5-2: Exon/Intron Übergänge der identifizierten genomischen Sequenzen	77
Tab. 5-3: Aufstellung der durch Durchflusszytometrie getesteten primären Zellen und Zelllinien	82

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CHIR	Chicken Ig-like Rezeptor
Ci	Curie
ConA	Concanavalin A
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleid Acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EST	Expressed Sequence Tag
FACScan	Fluorescence-Activated-Cell-Scanner
Fc α R	Fc α Rezeptor
Fc-Fragment	konstante Region der schweren Kette des IgG Moleküls
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Iso-Thiocyanat
FSC	Forward scatter
GPDH	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
GPVI	Glykoprotein VI
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung (engl. <i>Hepes Buffered Saline</i>)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. <i>Horse Reddish Peroxidase</i>)
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
iIEL	intestinale intraepitheliale Lymphozyten
IL-6	Interleukin 6
ILT	Immunglobulin-like Transkript
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes inhibitorisches Motiv
KIR	Killer Zelle Ig-like Rezeptor
LAIR	Leukozyten-assoziiertes Ig-like Rezeptor
LB	Luria Broth
LIR	Leukozyten Ig-like Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
LRC	Leukozyten Rezeptor Cluster (engl. <i>Leukocyte Receptor Cluster</i>)
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
M _R	relatives Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
NITR	Neuer-Immun-Typ-Rezeptor
NKC	Natürliche Killerzellen Gen Komplex (engl. <i>Natural Killer Gene Complex</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>Open Reading Frame</i>)
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PIR	Paired Ig-likeRezeptor
POD	Meerrettich-Peroxidase
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleid Acid</i>)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHP	Src-homology-2-containing-Protein-Tyrosin-Phosphatase
SSC	Sideward scatter
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin

In den Abbildungen wurde der Buchstabencode für Aminosäuren verwendet.

1 Einleitung

Biologische Systeme basieren meist auf der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts von stimulierenden und hemmenden Signalen. Bei der physiologischen Regulation wirken so fast immer positive und negative Feedbacksysteme gemeinsam. Auch im Immunsystem gilt dieses Prinzip der Homöostase. So gibt es zahlreiche aktivierende und hemmende membranständige Rezeptoren oder auch lösliche Zytokine. Beispielsweise führt die durch Antigen getriebene klonale Expansion von Lymphozyten zu einer enormen Vermehrung antigenspezifischer Lymphozyten, die nach Elimination der Antigene wieder beseitigt werden, so dass nur wenige antigenspezifische Gedächtniszellen zurückbleiben. Störungen dieses Gleichgewichts führen zu Erkrankungen. Bei einem Verlust der aktivierenden Signale kann der Organismus nicht mehr im notwendigen Umfang auf Pathogene reagieren, während ein Verlust der inhibitorischen Signale zu Autoreaktivität und chronischen Entzündungsprozessen führen kann.

Bei der Signaltransduktion, d. h. bei der Übermittlung der Signale von der extrazellulären Seite ins Zellinnere spielen Oberflächenrezeptoren und Korezeptoren eine große Rolle. Bisher galt die Forschung vor allem den aktivierenden Rezeptoren des Immunsystems. So wurden in den letzten dreißig Jahren Struktur, genomische Organisation, Phylogenese Funktion und Signaltransduktion der antigenerkennenden Rezeptoren auf B- und T-Zellen genauestens untersucht. Auch zahlreiche sog. kostimulatorische Moleküle, die die Immunantwort unterstützen wurden charakterisiert.

Seit etwa fünf Jahren werden auch die inhibitorischen Oberflächenrezeptoren genauer charakterisiert. Zuerst konnten entsprechende Rezeptoren bei Mensch und Maus identifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass manche auf bestimmte Zellarten beschränkt waren, andere auf einer Vielzahl von myeloiden und lymphoiden Zellen exprimiert wurden. Die Erkenntnis, dass inhibitorische Rezeptoren auf den Zellen des Immunsystems ebenso weit verbreitet sind wie aktivierende, war ein weiterer Hinweis auf die wichtige Bedeutung dieser Rezeptoren. Bei einigen inhibitorischen Rezeptoren ist die Funktion bereits bekannt, aber bei der überwiegenden Zahl dieser Rezeptoren müssen die genaue Expression, potentielle Liganden und letztlich deren Funktion noch charakterisiert werden.

2 Literaturübersicht

In letzter Zeit wurde eine Vielzahl neuer Multigenfamilien mit regulatorischer Bedeutung für das Immunsystem charakterisiert. Dabei handelt es sich um inhibitorische und aktivierende Rezeptoren, die auf bestimmten Chromosomenabschnitten relativ dicht aneinandergereiht liegen. Mittlerweile wurden über zehn dieser Genfamilien auf verschiedenen Chromosomenabschnitten beschrieben, die einige typische Charakteristika aufweisen. Alle Gene dieser Rezeptorfamilien kodieren für Proteine, die als Membranproteine in die Zellmembran eingelagert werden und aus einem extrazytoplasmatischen, einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Bereich bestehen. Es handelt sich also um Gene, die für Zellrezeptoren kodieren, die mit ihrem extrazytoplasmatischen Bereich Liganden binden, dadurch aktiviert werden und dann diese Signale durch ihren zytoplasmatischen Anteil durch biochemische Vorgänge ins Zellinnere weitergeben. Je nach Art der Signale kommt es letztlich zur Zellaktivierung oder -inhibition. Die Funktion der inhibitorischen Vertreter *in vivo* ist zum größten Teil schon geklärt, während man noch über eine mögliche Funktion der aktivierenden Rezeptoren spekuliert. Im Folgenden sollen einige dieser Rezeptorfamilien beschrieben werden. Dabei handelt es sich um Rezeptoren, die zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie gehören und auf einem gemeinsamen Chromosomenabschnitt liegen. Diese werden nachfolgend als Ig-like Rezeptoren bezeichnet.

2.1 Allgemeine Charakteristika der Ig-like Rezeptoren

Der extrazytoplasmatische, transmembrane und zytoplasmatische Bereich weisen jeweils charakteristische Strukturen auf, die eine weitere Einteilung der Rezeptoren ermöglichen und daher zunächst erläutert werden.

2.1.1 Extrazytoplasmatischer Bereich

Die Ig-like Rezeptoren sind Typ I transmembrane Proteine, d. h. der N-terminus befindet sich auf der extrazytoplasmatischen Seite. Als Mitglieder der Ig-Superfamilie besitzen sie im extrazytoplasmatischen Bereich eine unterschiedliche Anzahl von Ig-Domänen. Die Ig-Domänen bestehen aus β -Ketten, die durch Disulfidbrücken stabil gehalten werden und so eine β -Faltblattstruktur bilden. Je nach Anzahl der β -Ketten, der Aminosäure (AS)-Sequenz die sie umgibt und der Abstand der Cysteine, die die Disulfidbrücken bilden, werden sie in Ig-Domänen vom V, C1 oder C2 Typ eingeteilt [3]. Die hochvariablen, antigenerkennenden

Ig-Domänen von B- und T-Zell-Rezeptor sind z. B. vom V Typ, das Haupthistokompatibilitätskomplex (*MHC*) Molekül besitzt C1 Typ Ig-Domänen und alle Ig-like Rezeptoren bestehen aus C2 Typ Ig-Domänen.

2.1.2 Transmembraner und zytoplasmatischer Bereich mit Signaltransduktion

2.1.2.1 Inhibitorische Rezeptoren

Inhibitorische Rezeptoren sind durch eine ungeladene transmembrane Region und einen langen zytoplasmatischen Bereich mit einer unterschiedlichen Anzahl von sog. ITIMs (*Immunrezeptor Tyrosin-basierenden inhibitorischen Motiven*) gekennzeichnet. Ein ITIM besteht aus der Konsensussequenz von sechs AS. Die erste AS ist entweder Isoleucin, Valin, Leucin oder Serin, dann folgt eine variable AS, anschließend die für die Signaltransduktion wichtige AS Tyrosin, wieder zwei variable AS und als letztes Valin oder Leucin [4].

Werden inhibitorische Rezeptoren durch die Bindung an einen spezifischen Liganden aktiviert, kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinreste in den ITIMs und durch eine Konformationsänderung des zytoplasmatischen Bereichs zur Rekrutierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Es handelt sich dabei unter anderem um die Src-homology-2-containing-Protein-Tyrosin-Phosphatase (SHP)-1 und SHP-2. Diese dephosphorylieren durch Protein-Tyrosin-Kinasen vermittelte Phosphorylierungen. Unter normalen Bedingungen stehen Phosphatasen und Kinasen im Gleichgewicht, es kommt dadurch zur geringgradigen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Tyrosinresten. Nach Aktivierung überwiegen die durch Kinasen vermittelten Phosphorylierungen und nach Stimulation von inhibitorischen Rezeptoren kommt es zur Zunahme der Aktivität der Phosphatasen und somit zu starker Dephosphorylierung. Dabei inhibieren die Phosphatasen die Signaltransduktion zu einem relativ frühen Zeitpunkt, so dass es weder zur Bildung von Inositol Phosphat, noch zur Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium kommt [5].

2.1.2.2 Aktivierende Rezeptoren

Der zytoplasmatische Anteil des aktivierenden Rezeptors ist nur sehr kurz, aber im transmembranen Bereich befindet sich eine positiv geladene AS. Diese assoziiert mit einem Adaptormolekül, das eine negativ geladene AS im transmembranen Bereich und nur einen sehr kurzen extrazytoplasmatischen Bereich besitzt, aber im zytoplasmatischen Anteil ein ITAM (*Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv*). Ein ITAM besteht aus der

Konsensussequenz von vier AS, die zweimal im Abstand von sechs bis acht AS vorhanden ist. Die erste AS ist Tyrosin, dann folgen zwei variable AS und am Ende befindet sich die AS Leucin [6].

Je nach Rezeptor werden unterschiedliche Adaptormoleküle assoziiert. Es handelt sich dabei um DAP12, FcεRIγ und CD3ζ, die immer als Homodimere exprimiert werden. Kommt es durch die Bindung eines Liganden zur Stimulation des aktivierenden Rezeptors, werden die Tyrosinreste im ITAM des Adaptormoleküls phosphoryliert und rekrutieren die Protein-Tyrosin-Kinase ZAP-70 bzw. Syk, was unter anderen zu einer intrazellulären Kalziumfreisetzung führt [5].

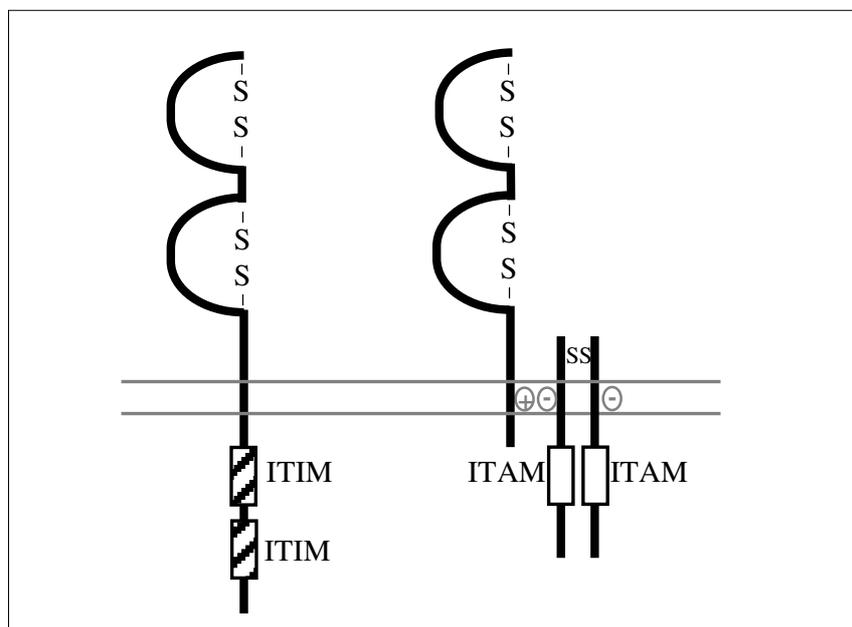


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines inhibitorischen und eines aktivierenden Ig-like Rezeptors. Im extrazytoplasmatischen Bereich besitzen beide durch Disulfidbrücken (SS) stabilisierte Ig-Domänen in unterschiedlicher Anzahl (hier z. B. zwei). Der inhibitorische Rezeptor (links) hat einen langen zytoplasmatischen Bereich mit einer unterschiedlichen Anzahl von ITIMs (hier z. B. zwei). Der aktivierende Rezeptor (rechts) hat eine positiv geladene AS im transmembranen Bereich und assoziiert mit einem ITAM-haltigen Adaptormolekül, das als Homodimer exprimiert wird.

2.2 Leukozyten Rezeptor Cluster

Vier Gruppen von Ig-like Rezeptoren liegen auf einem gemeinsamen Chromosomenabschnitt. Es handelt sich dabei um den Leukozyten Rezeptor Cluster (*LRC*), ein ca. ein Megabasenpaar großes Cluster [7], das beim Menschen auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert ist [8]. Wie in Abb. 2-2 auf S.5 dargestellt, enthält dieses Cluster vier Gruppen; zum einen die Ig-like Transkripte (*ILT*) und zum anderen die Leukozyten-assoziierten Ig-like Rezep-

toren (*LAIR*). Die dritte Gruppe umfasst die Killer Zellen Ig-like Rezeptoren (*KIR*) und das Glykoprotein VI (*GPVI*) und die vierte Gruppe den $Fc\alpha R$ Rezeptor (*Fc α R*) und NKp46 [9].

Bei einem Vergleich des humanen LRC auf Chromosom 19q13.4 mit dem bei der Maus auf dem syntenischen Chromosom 7 lokalisierten LRC (siehe Abb. 2-2) fällt auf, dass bei der Maus nur die zu den ILT homologen Paired Ig-like Rezeptoren (*PIR*) vorkommen, aber keine *LAIR*, *KIR* und kein $Fc\alpha R$ [9].

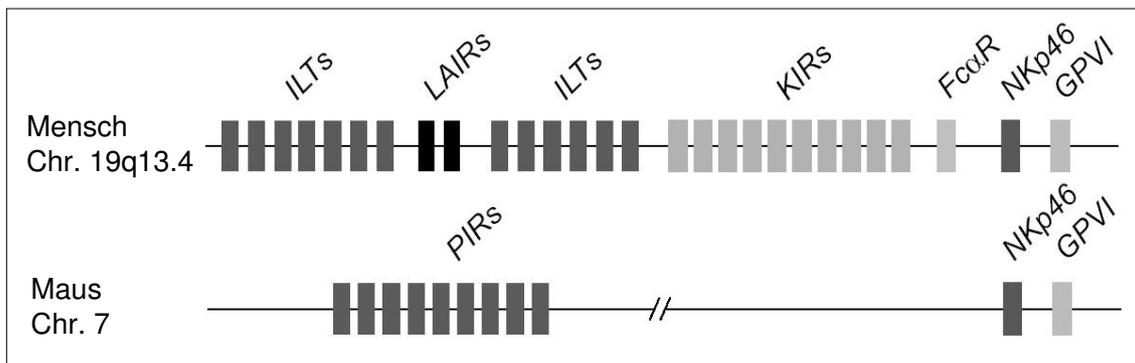


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der im LRC kodierenden Ig-like Rezeptoren auf Chromosom 19q13.4. Beim Menschen sind dort ILTs, LAIRs, KIRs, $Fc\alpha R$, NKp46 und GPVI lokalisiert, während auf dem syntenischen Chromosom 7 bei der Maus nur PIRs, NKp46 und GPVI zu finden sind. Abbildung modifiziert nach Barten et al. [1].

Im Nachfolgenden sollen die Funktion, Struktur, Signaltransduktion und genomische Organisation der im LRC lokalisierten Ig-like Rezeptoren genauer charakterisiert werden.

2.2.1 KIR

2.2.1.1 Funktion

Alle KIR sind auf Natürlichen Killer (*NK*)-Zellen und z. T. auch auf bestimmten T-Zellen des Menschen exprimiert. *NK*-Zellen gehören zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Die KIR auf den *NK*-Zellen binden an die verschiedenen MHC I Moleküle des Menschen, auch humane Leukozyten Antigene (*HLA*) genannt. Kommt die Bindung zustande, erhält die *NK*-Zelle ein inhibitorisches Signal durch den KIR. Bei vielen virusinfizierten und tumorös entarteten Zellen wird das MHC I Molekül nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert. Dadurch fehlt das durch den KIR vermittelte inhibitorische Signal, die aktivierenden Signale in der *NK*-Zelle überwiegen und die Zielzelle wird lysiert (sog. „Missing-self Hypothese“ [10]). Eine schematische Darstellung der Funktionsweise der KIR ist in Abb. 2-3 auf S.6 zu sehen.

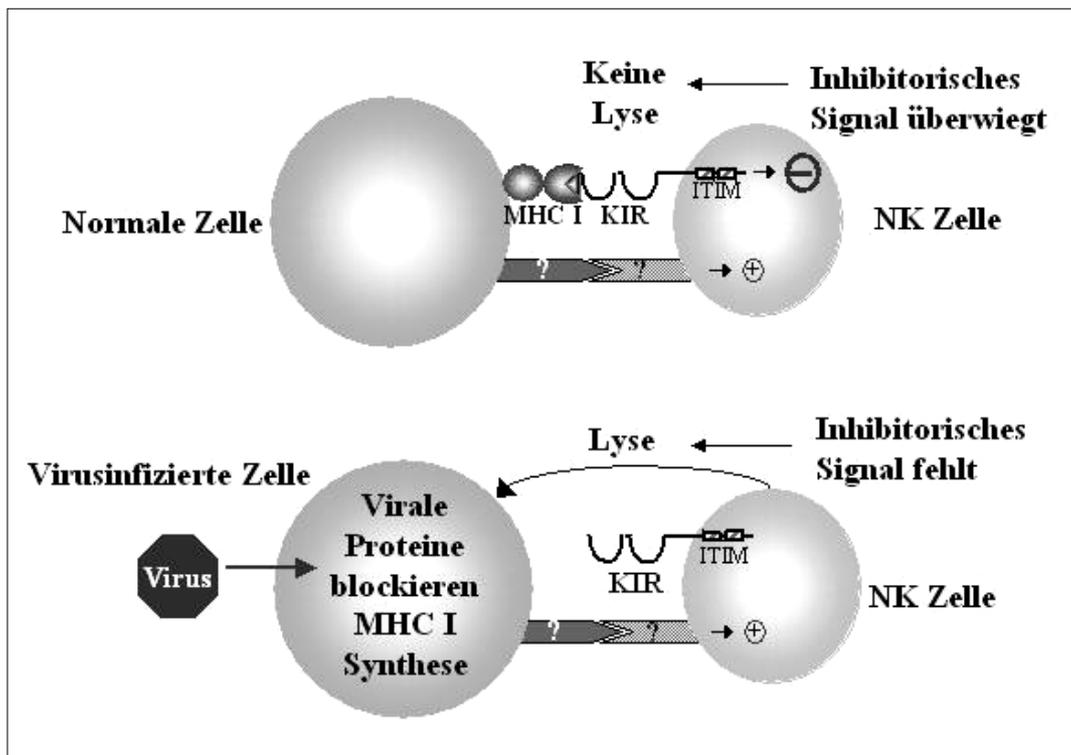


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der KIR auf NK-Zellen. Im oberen Teil bindet KIR an das MHC I Molekül und es kommt dadurch zu einem inhibitorischen Signal in der NK-Zelle. Im unteren Teil wird die MHC I Synthese der Zelle viral unterdrückt und es kommt zur Zelllyse durch die NK-Zelle, da das inhibitorische Signal des KIR fehlt und somit die aktivierenden Signale überwiegen.

2.2.1.2 Struktur und Nomenklatur

Im extrazytoplasmatischen Bereich der KIR befinden sich zwei bzw. drei Ig-Domänen vom C2 Typ. Die inhibitorischen Vertreter besitzen einen langen zytoplasmatischen Anteil mit zwei ITIMs. Die aktivierenden haben nur einen kurzen zytoplasmatischen Anteil, aber in ihrem transmembranen Bereich befindet sich die positiv geladene AS Lysin, die an das ITAM-haltige Adaptormolekül DAP12 bindet [11]. Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften wird für KIR folgende Nomenklatur verwendet: KIR mit zwei Ig-Domänen werden als KIR2D, KIR mit drei Ig-Domänen als KIR3D bezeichnet. Handelt es sich um einen inhibitorischen Rezeptor mit einem langen zytoplasmatischen Bereich wird er z. B. KIR2DL (L für engl. „long“) bezeichnet, bei einem aktivierenden Rezeptor wird dieser als KIR2DS bezeichnet, wobei S für engl. "short" steht, also für einen kurzen zytoplasmatischen Bereich. Die letzte Zahl im Namen eines KIR, z. B. KIR2DL1 steht für die fortlaufende Nummerierung eines KIR abhängig vom Zeitpunkt der Entdeckung.

KIR2DL4 nimmt eine Sonderstellung ein [12]. Zum einen besitzt er die positiv geladene AS Arginin im transmembranen Bereich, die aber an keines der bekannten Adaptormoleküle (DAP12, FcεRIγ und CD3ζ) bindet [13]. Zum anderen hat KIR2DL4 einen langen zyto-

plasmatischen Anteil mit einem ITIM. Funktionell konnten sowohl die aktivierende [14] als auch die inhibitorische [15] Wirkungsweise nachgewiesen werden. Interessanterweise ist KIR2DL4 auf allen NK-Zellen exprimiert [16], während alle anderen KIR auf verschiedene Untergruppen von NK-Zellen begrenzt sind. Außerdem ist er im Gegensatz zu allen anderen KIR bei allen bisher untersuchten Primaten hochkonserviert [13].

Eine Zusammenfassung aller KIR und der von ihnen gebundenen HLA-Molekülen befindet sich in Tab. 2-1.

KIR	Ig-Domänen	ITIMs bzw. Adaptormolekül	Wirkungsweise	Ligand
KIR2DL1 bis KIR2DL3	2	2	Inhibitorisch	HLA-C
KIR2DL4	2	1, Arginin in TM	Inhibitorisch und aktivierend	HLA-G (?)
KIR2DL5	2	2	Inhibitorisch	nicht bekannt
KIR3DL1 bis KIR3DL3	3	2	Inhibitorisch	HLA-A
KIR2DS1 bis KIR2DS5	2	DAP12	Aktivierend	HLA-C

Tab. 2-1: Zusammenfassung der identifizierten KIR beim Menschen [11]. TM steht für transmembraner Bereich. Das Fragezeichen bedeutet, dass unterschiedliche Angaben über den Liganden in der Literatur vorhanden sind.

2.2.1.3 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion der inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren wurde bereits in Abschnitt 2.1.2, S.3 beschrieben. Hier wird auf die KIR spezifischen Besonderheiten bei der Signaltransduktion eingegangen.

Kommt es zur Bindung des MHC I Moleküls mit dem inhibitorischen KIR, werden die ITIMs phosphoryliert und die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 rekrutiert [17]. Der inhibitorische und aktivierende KIR2DL4 rekrutiert durch sein N-terminales ITIM nur SHP-2, diese kann in schwächerer Form auch schon durch ein nicht phosphoryliertes ITIM gebunden werden. Auch für das N-terminale ITIM von klassischen KIR mit zwei ITIMs konnte dies gezeigt werden. SHP-1 wird bei diesen aber nur durch beide phosphorylierte ITIMs rekrutiert [15].

2.2.1.4 Genomische Organisation

Zuerst soll auf die Anzahl und Anordnung der kodierenden (Exons) und nicht-kodierenden (Introns) Bereiche der KIR Gene eingegangen werden. Die Exon/Intronstruktur weist bei den KIR einerseits typische Merkmale auf, die bei der gesamten Ig-Superfamilie konserviert sind. Andererseits gibt es auch einige Besonderheiten, die nur bei Ig-like Rezeptoren vorgefunden werden. So wird in der Ig-Superfamilie generell jede Ig-Domäne und der transmembrane Bereich von einem separaten Exon kodiert. Bei allen Ig-like Rezeptoren wird dagegen das Signalpeptid von zwei getrennten Exons kodiert. Bei den KIR befindet sich zwischen der membranproximalen Ig-Domäne und dem transmembranen Bereich ein kurzes Exon, das für das Verbindungsstück kodiert (fehlt bei KIR3DL3). Der zytoplasmatische Bereich ist auf zwei Exons verteilt, wobei das letzte Exon für beide ITIMs kodiert [18] (siehe Abb. 2-4).

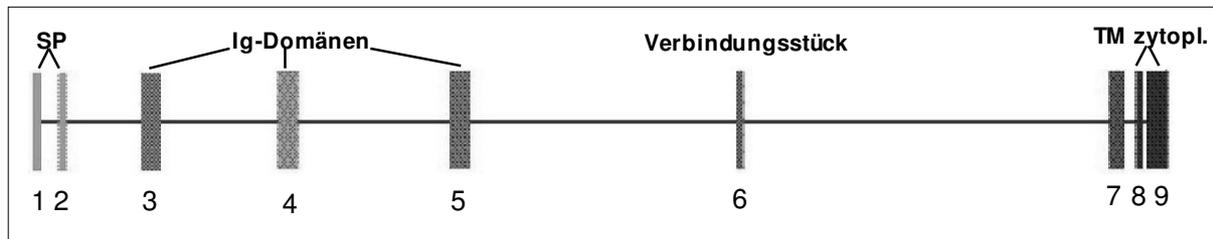


Abb. 2-4: Exon/Intronstruktur der KIR. Das Signalpeptid (SP) wird durch Exon 1 und 2 kodiert, jede Ig-Domäne liegt auf je einem Exon und Exon 6 kodiert für das Verbindungsstück. Der transmembrane Bereich (TM) wird auch durch ein Exon kodiert, während der zytoplasmatische Bereich auf zwei Exons verteilt ist

Wie bereits in Tab. 2-1 auf S.7 beschrieben, gibt es KIR mit zwei und drei Ig-Domänen. Rezeptoren mit drei Ig-Domänen besitzen eine membrandistale D0, eine mittlere D1 und eine membranproximale D2 Domäne, die auf den Exons 3 - 5 kodieren. Die KIR mit zwei Ig-Domänen lassen sich nach der Homologie der Ig-Domänen in zwei Gruppen einteilen. KIR2D vom Typ I (KIR2DL1-3 und KIR2DS1-5) haben die Konfiguration D1 und D2, wobei die D0 Domäne im Genom immer als Pseudoexon vorhanden ist [19]. KIR2D vom Typ II (KIR2DL4 und 5) besitzen die Ig-Domänen D0 und D2, haben aber kein Pseudoexon für D1 [2] (siehe Abb. 2-5, S.9).

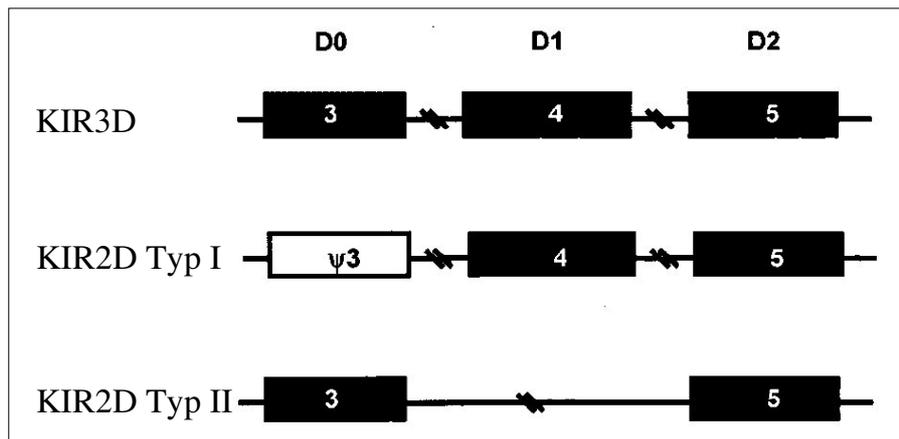


Abb. 2-5: Organisation der Exons, die für die verschiedenen Ig-Domänen der KIR kodieren. KIR3D besitzen alle drei Exons für die D0, D1 und D2 Ig-Domäne. KIR2D vom Typ I exprimieren nur D1 und D2, besitzen aber für D0 ein Pseudoexon im Gen. KIR2D vom Typ II exprimieren D0 und D2 besitzen aber kein Pseudoexon für D1. Abbildung modifiziert nach Vilches et al. [2].

Aktivierende KIR unterscheiden sich in ihrem genomischen Aufbau nicht von den inhibitorischen Genen. Sie besitzen die gleiche Anzahl und Anordnung der Exons und Introns. Allerdings weisen sie am Beginn des zytoplasmatischen Abschnitts einen Basenaustausch auf, der zu einem Stopp Codon führt. Dadurch kommt es zu einem Verlust der ITIMs. Besonders auffällig ist das bei KIR3DL1 und KIR3DS1 (siehe Abb. 2-6, S.10), denn sie sind nur Allele eines Gens auf demselben Locus [1]. Die positive AS im transmembranen Bereich kann auch durch entsprechende Mutationen in diesem Bereich erklärt werden.

Die Analyse der Basenpaarsequenzen an den Exon/Intron Übergängen zeigt, dass die gt-ag Regel befolgt wird [20]. D. h. alle Introns beginnen am 5' Ende mit den Basen Guanin und Thymin und enden am 3' Ende mit Adenin und Guanin. Dies ist typisch für alle Ig-like Rezeptoren, genau wie die Phasen der Exons. Diese können grundsätzlich in Phase 1, 2 oder 0 sein. Phase 0 bedeutet, dass das gesamte Basentriplet, das für eine AS kodiert, am 3' Ende des Exons vorhanden ist. Exons in Phase 1 besitzen an ihrem 3' Ende nur eine Base des kodierenden Triplets, Exons in Phase 2 haben dort 2 Basenpaare. Bei Ig-like Rezeptoren befinden sich alle extrazytoplasmatischen und transmembranen Exons in Phase 1, die zytoplasmatischen variieren je nach Rezeptor in ihren Phasen [21].

2.2.1.5 Polymorphismus der KIR Gene

Die KIR bilden aus verschiedenen Gründen eine hochpolymorphe Rezeptorfamilie. Zum einen gibt es viele verschiedene KIR, die als Mitglieder einer Multigenfamilie im LRC des Menschen lokalisiert sind (siehe Tab. 2-1, S.7). Zum anderen existieren in der Population bis

zu 15 verschiedene Haplotypen für einen Rezeptor. Deletionen einzelner Gene oder ganzer Gengruppen fördern zudem die individuelle Variabilität zur Anzahl der exprimierten Rezeptoren. Außerdem unterscheiden sich die einzelnen Subpopulationen der NK-Zellen in ihrem Expressionsmuster, d. h. je nach Subpopulation werden verschiedene Rezeptoren exprimiert [18]. Gründe für die Entstehung einer derart variantenreichen Rezeptorgruppe könnten in der hohen Homologie der Exons und Introns zueinander und der engen Lage der Gene in gleicher Orientierung auf dem Chromosom liegen. Dadurch wird die Crossing-Over-Wahrscheinlichkeit und auch die Wahrscheinlichkeit von Geninsertion, -deletion und -rekombination stark erhöht [22].

Dieser hohe Polymorphismus der KIR entspricht dem vergleichbar hohen Polymorphismus des Liganden, dem MHC I Molekül, und stellt ein wichtiges Beispiel der Koevolution eines Rezeptor-Ligand Systems dar [1].

Interessanterweise gibt es neben diesen hochpolymorphen KIR Genen drei KIR, die bei allen Haplotypen identisch sind. Es handelt sich hier um KIR3DL3, KIR3DL2 und KIR2DL4. Die ersten beiden bilden das vordere und hintere Ende des sich ständig verändernden Locus (siehe Abb. 2-6) und dienen wahrscheinlich als eine Art „Rahmen“ für die vielen Mutationen und Duplikationen innerhalb des Locus. KIR2DL4 wird von einer Sequenz (X), die nur einmal im gesamten Locus vorkommt, flankiert und dadurch wahrscheinlich stabil gehalten [1].

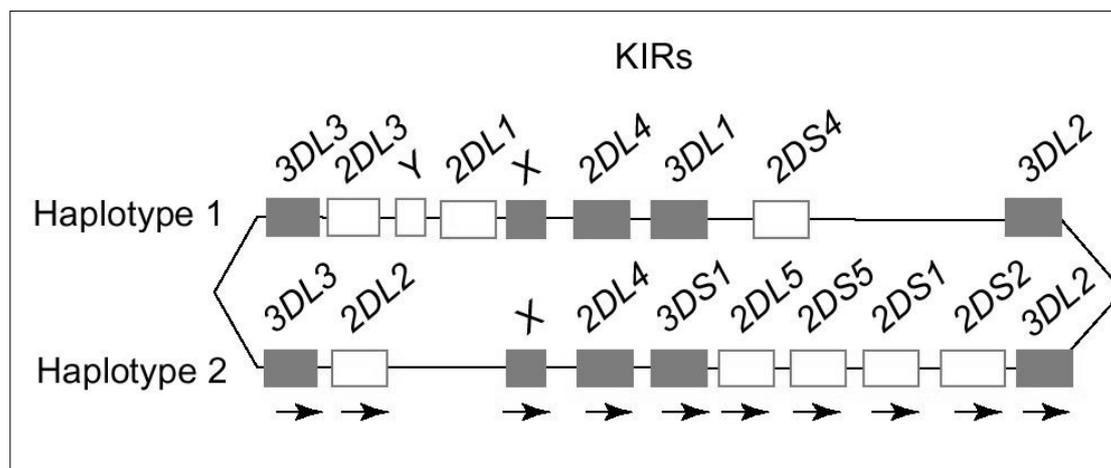


Abb. 2-6: Organisation der KIR beim Menschen auf Chromosom 19q13.4. Die Orientierung der Gene ist mit einem Pfeil markiert. Zur besseren Verdeutlichung des Polymorphismus sind zwei verschiedene Haplotypen abgebildet. Abbildung modifiziert nach Barten et al. [1].

2.2.1.6 Phylogenesese der KIR Gene

Die KIR Gene sind jedoch nicht nur innerhalb der menschlichen Population hochpolymorph, es gibt auch große Unterschiede der humanen KIR zu den, bei anderen Primaten identi-

zierten KIR [23]. Das deutet darauf hin, dass es sich um einen relativ jungen Genloкус handelt. Durch Hybridisierung von humanen KIR Genen mit DNA verschiedener Spezies im Southern Blot (sog. Zooblot), konnte der Ursprung der KIR Gene auf eine Zeit von ungefähr 100 Millionen Jahren zurückdatiert werden [24].

KIR Gene sind außer bei den Primaten nur noch beim Rind identifiziert worden (siehe Abschnitt 2.3.1, S.16). Beim Nager gibt es keine Hinweise auf KIR (siehe dazu auch Abb. 2-2, S.5). Auch aus diesen Befunden geht hervor, dass es sich bei den KIR um eine phylogenetisch relativ junge Familie handelt.

Bei der Maus gibt es zwar keine direkten KIR Orthologe, allerdings haben die murinen Ly49 Rezeptoren identische Funktionen, d. h. sie sind vergleichbare inhibitorische Rezeptoren auf murinen NK-Zellen, die an MHC I Moleküle binden. Sie gehören zur Gruppe der C Typ Lektine und liegen als Multigenfamilie im sog. NK-Zellen Gen Komplex (NKC) auf Chromosom 6. Interessanterweise befindet sich im NKC des Menschen auf dem syntenischen Chromosom 12 nur ein einziges nicht exprimiertes Ly49 Pseudogen [1]. So wie bei der Maus die KIR Gene fehlen, ist beim Menschen kein funktionelles Ly49 Gen nachzuweisen.

2.2.2 ILT

Die zweite große Multigenfamilie im LRC sind die ILT, auch Leukozyten Ig-like Rezeptoren (LIR) genannt.

2.2.2.1 Struktur und Signaltransduktion

Die Struktur der ILT entspricht grundsätzlich dem Aufbau der Ig-like Rezeptoren. Die ILT haben meist 4 extrazytoplasmatische Ig-Domänen. ILT3 bildet mit 2 Ig-Domänen eine Ausnahme, wobei diese beiden ihrer Homologie nach der ersten und letzten Ig-Domäne der anderen ILT entsprechen [21]. Die inhibitorischen Vertreter haben vier ITIMs in ihrem zytoplasmatischen Bereich. Phosphorilierte ITIMs rekrutieren nur die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 und eine Stimulation des inhibitorischen ILT2 führt z. B. zur Hemmung von FcεR-induzierter Serotoninfreisetzung in Mastzellen [25]. Die aktivierenden ILT besitzen im Unterschied zu den KIR die positiv geladene AS Arginin im transmembranen Bereich und nicht Lysin und assoziieren mit dem ITAM-haltigen Adaptormolekül FcεRIγ und nicht DAP12 [26]. Eine Stimulation des aktivierenden ILT1 führt z. B. bei Mastzellen zu Degranulation und erhöhter Kalziummobilisierung [26]. ILT9 und 10 sind vermutlich

Pseudogene, da keine Transkripte dieser Gene gefunden werden konnten [18]. Eine detaillierte Zusammenfassung aller identifizierten ILT befindet sich in Tab. 2-2.

2.2.2.2 Expression

Im Gegensatz zu den KIR weisen die ILT eine Expression auf vielen verschiedenen lymphoiden und myeloiden Zellen auf. Alle ILT sind auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert, ILT1 und 5 zusätzlich noch auf Granulozyten. ILT2 befindet sich auch auf B-Zellen und Subpopulationen von T- und NK-Zellen. Auf T-Zell-subpopulationen befindet sich auch ILT5 und auf NK-Zellsubpopulationen auch ILT1 [27].

2.2.2.3 Liganden und Funktion

Bei den meisten, der erst 1997 entdeckten Rezeptoren, ist der Bindungspartner noch unbekannt. ILT2 und ILT4 binden an MHC I Moleküle, aber im Gegensatz zu den KIR, die an die hochpolymorphe $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Untereinheit binden, binden die ILT an die stärker konservierte $\alpha 3$ Domäne des MHC I Moleküls [9]. Ein ILT kann so an verschiedene HLA Subklassen, wie z. B. HLA-A, -B und -G, binden. In nachfolgender Tabelle werden alle beim Mensch charakterisierten ILT zusammengefasst.

ILT	Ig-Domänen	ITIMs bzw. Adaptormolekül	Wirkungsweise	Ligand
ILT1, ILT7, ILT8, LIR6	4	Fc ϵ RI γ	Aktivierend	nicht bekannt
ILT2 und ILT4	4	4	Inhibitorisch	HLA-A, -B und -G
ILT3	2	4	Inhibitorisch	nicht bekannt
ILT5, LIR8	4	4	Inhibitorisch	nicht bekannt
ILT6	4	nicht vorhanden	Löslich	nicht bekannt

Tab. 2-2: Zusammenfassung der identifizierten ILT beim Menschen [27].

Auch die Funktion der inhibitorischen und aktivierenden Vertreter ist größtenteils noch unklar. Es ist aber davon auszugehen, dass diese Rezeptoren immunmodulatorische Funktionen besitzen [28].

2.2.2.4 Genomische Organisation

Die Anzahl und Anordnung der Exons und Introns verhält sich im extrazytoplasmatischen und transmembranen Bereich wie bei den KIR. Im Gegensatz dazu befindet sich bei den ILT zwischen der membranproximalen Ig-Domäne und dem transmembranen Bereich nicht ein, sondern zwei Exons für das Verbindungsstück. Außerdem kodieren bis zu sechs Exons für den zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors. Ein weiterer Unterschied findet sich bei den aktivierenden ILT, bei denen keine Exons für einen langen zytoplasmatischen Bereich vorhanden sind [18].

ILT6 bildet ein lösliches Protein, da es für den transmembranen und zytoplasmatischen Bereich nur Pseudoexons besitzt [29].

2.2.2.5 Polymorphismus und Phylogense der ILT Gene

Die ILT sind wesentlich weniger polymorph als die KIR [24]. Dies könnte an der geringgradigen Sequenzhomologie ihrer Introns liegen und daran, dass sie im Vergleich zu den KIR auf einem wesentlich längeren Chromosomenabschnitt verteilt sind [7]. Es gibt aber auch bei den ILT Ausnahmen. ILT6 ist z. B. nicht in allen Individuen exprimiert und für ILT5 sind 17 verschiedene Haplotypen bekannt [1].

Hypothesen zur Entstehung der ILT Gene gehen von multiplen Duplikationen eines primordialen ILT Vorläufergens (LIR6) aus, die zunächst zu einem ILT Cluster führten. Die chromosomale Organisation weist beim Menschen allerdings zwei getrennte Gencluster mit jeweils sechs bis sieben verschiedenen Rezeptoren auf, die in entgegengesetzter Orientierung aneinander liegen und beide mit dem LAIR Locus assoziiert sind. Diese Organisation deutet auf eine Duplikation des gesamten ILT Clusters während der Evolution hin [24].

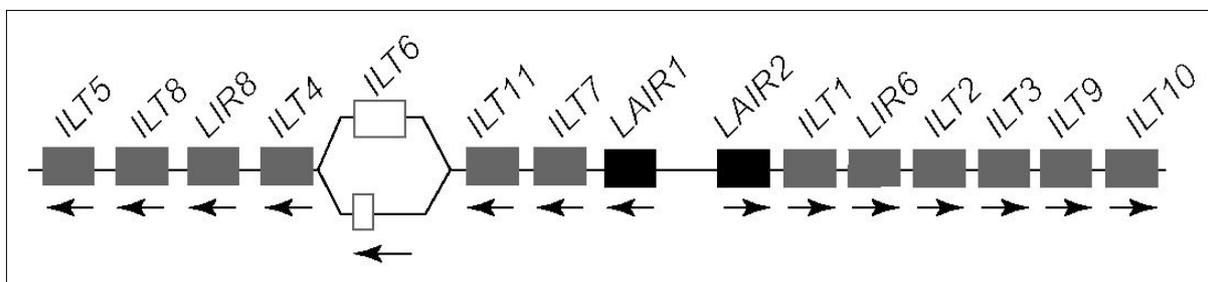


Abb. 2-7: Organisation der ILT Gene beim Menschen auf Chromosom 19q13.4. Die Orientierung der Gene ist mit einem Pfeil markiert. Die ILT Gene sind in zwei Clustern in entgegengesetzter Orientierung angeordnet, die jeweils mit einem LAIR Gen assoziiert sind. Abbildung modifiziert nach Barten et al. [1].

Es gibt einige Hinweise dafür, dass die ILT Gene phylogenetisch älter sind als die KIR Gene. So gibt es eine orthologe Genfamilie bei Nagern, die als PIR (s. u.) bezeichnet werden.

Außerdem konnten bei der sog. Zoo Blot Analyse, bei der DNA verschiedener Vertebraten mit ILT spezifischen Gensonden hybridisiert wird, noch bei der DNA des Huhns positive Hybridisierungsbefunde detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ILT auch schon vor 300 Millionen Jahren vorhanden waren [24].

2.2.3 PIR

2.2.3.1 Struktur und Signaltransduktion

Die den humanen ILT vergleichbaren PIR der Maus wurden etwa zur selben Zeit identifiziert. Diese werden in acht verschiedene aktivierende Rezeptoren, PIR-A und einen inhibitorischen PIR-B unterteilt. Beide Rezeptortypen haben sechs Ig-Domänen in ihrem extrazytoplasmatischen Anteil. PIR-B hat vier ITIMs im zytoplasmatischen Bereich, wobei aber nur das dritte und vierte funktionell aktiv ist. Nach Stimulation des Rezeptors kommt es auch hier zur Assoziation der Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 [30]. Interessanterweise ist PIR-B in Makrophagen und B-Zellen konstitutiv phosphoryliert, während er in Milzzellen permanent mit SHP-1 assoziiert ist [31]. Eine Stimulation von PIR-B auf B-Zellen führt zu einer Inhibition von B-Zell-Rezeptor vermittelter Aktivierung [30]. PIR-A besitzt die positiv geladene AS Arginin im transmembranen Bereich und assoziiert mit dem Adaptormolekül Fc ϵ RI γ [32]. Eine Aktivierung, z. B. von PIR-A führt bei Mastzellen zu Degranulation und erhöhter Kalziummobilisierung [31].

2.2.3.2 Expression, Liganden und Funktion

PIR sind auf B-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert. Weil Transkripte beider Rezeptortypen in derselben Zellart gefunden wurden, werden sie als „Paired“ Ig-like Rezeptoren bezeichnet. Neuere Daten zeigen aber, dass PIR-B außerdem auf Thrombozyten und Megakaryozyten vorhanden ist [31].

Die Liganden sind ebenso wie die Funktion dieser Rezeptoren bis heute unbekannt, man nimmt aber an, dass es sich bei den Liganden auch um MHC I Moleküle handelt. Außerdem wird eine immunregulatorische Funktion, ähnlich wie bei den ILT, vermutet.

2.2.4 Weitere Ig-like Rezeptoren im LRC

Bei den folgenden Vertretern der Ig-like Rezeptoren handelt es sich um Rezeptoren, die auch im LRC lokalisiert sind. Sie haben allerdings andere Funktionen und binden nicht an MHC I Moleküle [9].

2.2.4.1 LAIR

LAIR ist ein inhibitorischer Rezeptor, der auf allen Leukozyten des Menschen exprimiert ist [33]. Er besteht aus einer Ig-Domäne und zwei ITIMs im zytoplasmatischen Anteil. Außerdem kommt dieser Rezeptor auch in löslicher Form vor [34]. Als Ligand wurde das epitheliale zelluläre Adhäsionsmolekül identifiziert [35]. Die Funktion ist weitgehend unbekannt.

2.2.4.2 Fc α R

Der Fc α R ist ein aktivierender Rezeptor beim Mensch, der aus zwei extrazytoplasmatischen Ig-Domänen besteht. Im transmembranen Bereich besitzt er die positiv geladene AS Arginin, die mit dem ITAM-haltigen Adaptormolekül Fc ϵ RI γ assoziiert. Der Fc α R ist auf Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen exprimiert und bindet humanes IgA₁ und IgA₂ und sekretorisches IgA [36].

2.2.4.3 NKp46

Der aktivierende Rezeptor NKp46 kommt bei Mensch und Maus vor und besteht aus zwei Ig-Domänen. Im transmembranen Bereich befindet sich die positiv geladene AS Arginin, die mit dem ITAM-haltigen Adaptormolekül CD3 ζ assoziiert. Beim Mensch ist NKp46 auf NK-Zellen exprimiert, sein Ligand ist jedoch unbekannt. Bei der Maus wird er auf lymphoiden Zellen exprimiert und bindet virales Hämagglutinin [37].

2.2.4.4 GPVI

GPVI ist ein Kollagenrezeptor auf Thrombozyten von Mensch und Maus. Er ist ein aktivierender Rezeptor, der zwei extrazytoplasmatische Ig-Domänen und im transmembranen Bereich die AS Arginin besitzt, die mit dem Adaptormolekül Fc ϵ RI γ assoziiert [38].

2.3 Ig-like Rezeptoren in anderen Spezies

2.3.1 Rind

Beim Rind wurden 2002 verschiedene NK-Zell-Rezeptoren zum ersten Mal charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass multiple KIR Gene vorhanden sind. Es konnten vier verschiedene bovine KIR dargestellt werden. KIR2DL1, KIR2DS1, KIR3DL1 und KIR3DS1, wobei die Nomenklatur sich nur auf strukturelle Eigenschaften bezieht, nicht auf mögliche Homologien zu den beim Menschen bekannten Rezeptoren. Die inhibitorischen Vertreter besitzen ein bzw. zwei ITIMs. Die aktivierenden haben in ihrem transmembranen Bereich die positiv geladene Aminosäure Arginin (wie alle ILT/PIR und KIR2DL4) [39]. Die bovinen KIR Gene wurden auf Chromosom 18 lokalisiert, dem zu humanen Chromosom 19q13.4 syntenischen Bereich.

Verwandtschaftsanalysen von bovinen KIR mit humanen KIR ergaben, dass sich diese beim Rind parallel zu den Primaten entwickelt haben, da sich die beim Rind gefundenen Gene sehr stark von den humanen KIR unterscheiden [40].

2.3.2 Fisch

Die Erforschung von Ig-like Rezeptoren beim Fisch erfolgte an verschiedenen Spezies. 1999 wurde diese Familie zum ersten Mal beim Pufferfisch (*Spheroides nephelus*) identifiziert. Dabei handelt es sich um eine Multigenfamilie, die aus ca. 24 verschiedenen Mitgliedern, den sog. Neuen-Immun-Typ-Rezeptoren (*NITR*) besteht. Mittlerweile konnten eine ähnliche große Anzahl verschiedener NITR auch bei anderen Knochenfischen, wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) [41], dem Wels (*Ictalurus punctatus*) [42] und der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) [43] identifiziert und näher charakterisiert werden.

Die NITR besitzen in ihrem extrazytoplasmatischen Anteil eine bis zwei Ig-Domänen, bei denen eine vom V Typ ist, wie sie auch bei den antigenerkennenden Ig-Domänen von B- und T-Zell-Rezeptor vorkommen (bei NITR werden diese aber nicht rearrangiert oder auf andere Weise variiert), die andere kann als C2 Typ identifiziert werden, wie sie in allen oben beschriebenen Ig-like Rezeptoren vorkommt. Diese Rezeptorfamilie könnte also eine mögliche phylogenetische Verbindung zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem darstellen [44]. Bei NITR mit nur einer Ig-Domäne handelt es sich um eine vom V Typ.

Die NITR variieren in ihrem zytoplasmatischen Bereich. Zum einen gibt es NITR, die ein oder zwei ITIMs in ihrem zytoplasmatischen Anteil besitzen, zum anderen gibt es auch

Vertreter, die im transmembranen Bereich die positiv geladene AS Arginin haben. Bei manchen folgt darauf nur ein sehr kurzer, bei anderen ein langer zytoplasmatischer Teil ohne ITIMs [42]. Es konnte aber noch nicht bewiesen werden, ob es sich dabei um einen funktionell aktivierenden Rezeptor handelt [45].

Bei NITR3.1 des Zebrafisches konnte durch Western Blot Analyse gezeigt werden, dass es nach Stimulation dieses Rezeptors zur Rekrutierung weiterer Signaltransduktionsmoleküle kommt. Außerdem wurde diese Multigenfamilie auf ein Chromosom beim Zebrafisch lokalisiert, das wahrscheinlich zum humanen LRC syntenisch ist [41].

Eine endgültige Zuordnung der NITR als ein ILT/KIR Homolog beim Fisch ist jedoch schwierig. Die Identifizierung der NITR Liganden, das Expressionsmuster und eine eindeutige Aussage über die chromosomale Lokalisation sollten dieser Zuordnung vorausgehen [45].

2.3.3 Huhn

Im Jahr 2000 konnten sog. Chicken Ig-like Rezeptoren (*CHIR*) beim Huhn identifiziert werden. Dabei wurde die PIR-B Sequenz der Maus verwendet, um eine Hühner-EST (*Expressed Sequence Tag*)-Datenbank auf ähnliche Rezeptoren zu untersuchen. Aus Milz konnte der potenziell inhibitorische Rezeptor, CHIR-B und ein möglicher aktivierender Rezeptor CHIR-A kloniert werden. Beide bestehen aus zwei Ig-Domänen. CHIR-B besitzt einen langen zytoplasmatischen Anteil mit zwei ITIMs und CHIR-A nur einen sehr kurzen zytoplasmatischen Anteil, aber die positiv geladene AS Histidin im transmembranen Bereich. Hybridisierung von CHIR-A und -B mit genomischer DNA in einem Southern Blot ergab, dass sie wahrscheinlich Mitglieder einer Multigenfamilie sind. Außerdem konnten durch RT-PCR spezifische Transkripte in verschiedenen B- und T-Zelllinien dargestellt werden [46].

3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Ig-like Rezeptoren beim Huhn. Diese neuen CHIR sollten mit den zwei bekannten Vertretern verglichen werden und vor allem sollten alle CHIR eingehend charakterisiert werden.

Dazu wurden im Einzelnen folgende Teilziele angestrebt:

- Identifizierung neuer Ig-like Rezeptoren beim Huhn durch EST-Datenbankrecherche
- Charakterisierung der Exon/Intron Strukturen
- Nachweis der Zugehörigkeit zu einer Multigenfamilie
- Charakterisierung der Gewebeverteilung durch
 - RT-PCR
 - Northern Blot
 - Färbung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAk)
- Biochemische Analyse der Rezeptorstruktur
- Nachweis phosphorlierter ITIMs und der rekrutierten Signaltransduktionsmoleküle
- Nachweis der inhibitorischen Wirkungsweise auf Zellen

4 Material und Methoden

4.1 Tiere und Tierhaltung

4.1.1 Hühner

Für die Blut- und Organentnahmen wurden zum einen B19-Hühner (MHC-I-Haplotyp B¹⁹/B¹⁹) und M11-Hühner (B¹⁵/B¹⁵) aus hauseigener Zucht, zum anderen LSL-Hühner von Lohmann, Cuxhaven verwendet.

Die Tiere wurden in kleinen Gruppen in Gitterrostkäfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt.

4.1.2 Mäuse

Für die Immunisierung zur Produktion mAk wurden Balb/c Mäuse aus hauseigener Zucht im Alter von ca. 6 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden in Kleingruppen in Macrolonkäfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt.

Diese Versuche wurden der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 211-253.6-14/2001 angezeigt.

4.2 Präparation von primären Hühnerleukozyten

4.2.1 Material

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

8,0	g	Natriumchlorid (NaCl) ^{2*}
1,45	g	Di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) ²
0,2	g	Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) ²
0,2	g	Kaliumchlorid (KCl) ²

1 x PBS: ad 1000 ml Aqua dest. (im Weiteren PBS bezeichnet)

10 x PBS: ad 100 ml Aqua dest.

auf pH 7,2 einstellen, für den Gebrauch in der Zellkultur autoklavieren, bei 4°C aufbewahren.

* Hochzahlen beziehen sich auf die Bezugsquellen, die im Anhang alphabetisch sortiert in einer Tabelle aufgeführt sind.

Dithiothreitol (DTT) 1 M

1,54 g Dithiothreitol¹⁹

ad 10 ml Aqua bidest., in Aliquots von 500 µl bei -20°C aufbewahren.

PBS mit 10 % FCS und 1 mM DTT (50 ml)

44,5 ml PBS

5,0 ml fetales Kälberserum (FCS, 30 min. bei 56°C inaktiviert)³,
im Folgenden FCS genannt

0,5 ml DTT 1 M

kurz vor dem Gebrauch herstellen.

44 % Percolllösung (20 ml)

8,8 ml Percoll¹

2,0 ml 10 x PBS

9,2 ml Aqua bidest

kurz vor dem Gebrauch herstellen.

67 % Percolllösung (20 ml)

13,4 ml Percoll¹

2,0 ml 10 x PBS

4,6 ml Aqua bidest

kurz vor dem Gebrauch herstellen.

Ficoll-Paque-Lösung¹**Trypanblau²**

Scrubbed Nylon fiber (3 denier, 3,81 cm, type 200) (Nylon-Wolle)⁶

4.2.2 Durchführung

Nach Betäubung wurde das Huhn durch Blutentzug getötet. Es wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Milz, dorsokranial vom Muskelmagen, die Bursa, dorsal am Enddarm, die Caecaltonsillen, am Übergang der Blinddärme zum Dickdarm, und das Duodenum entnommen. Außerdem wurde die Halsregion freipräpariert und die subkutan gelegenen Thymuslappen entfernt. Alle Organe wurden sofort nach Entnahme in 4°C kaltes PBS eingelegt. Für die Knochenmarkspräparation wurde der Femurknochen verwendet. Er wurde

an beiden Enden eröffnet und das Knochenmark mit kaltem PBS mit Hilfe einer Spritze mit 20G Kanüle herausgespült.

Die Blutentnahme erfolgte am lebenden Huhn mit einer Spritze aus der rechtsseitigen V. jugularis. Die peripheren Blutleukozyten (*PBL*) wurden durch Dichtezentrifugation gewonnen. Dabei wurden 5 ml mit Heparin versetztes Vollblut 1:2 mit PBS verdünnt und mit 10 ml Ficoll-Paque-Lösung unterschichtet. Nach 12-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur (*RT*) mit 600 x g wurden die sich in der Interphase befindenden *PBL* vorsichtig abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen.

Zur Präparation von Leukozyten aus Milz, Bursa, Thymus, Caecaltonsillen und Knochenmark wurde das Organ mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb mit der Maschenweite 0,75 mm x 0,75 mm gedrückt. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Röhrchen 10 min. auf Eis gestellt, damit noch vorhandene Gewebestücke sedimentieren konnten. Der Überstand wurde bei 4°C mit 225 x g 10 min. zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und mit 10 ml Ficoll-Paque-Lösung unterschichtet. Dies wurde wie bereits beschrieben zentrifugiert, die Leukozyten aus der Interphase abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen.

Für die Präparation von intestinalen intraepithelialen Lymphozyten (*iIEL*) wurde die Duodenalschleife verwendet. Um den Darminhalt zu entfernen, wurde das Darmstück mit Hilfe einer aufgesetzten Spritze mit PBS zweimal durchgespült. Der Darm wurde der Länge nach aufgeschnitten und in ca. 0,5 cm breite Stücke geschnitten. Diese wurden in einem Erlenmeyerkolben mit ca. 200 ml PBS dreimal durch Schwenken gewaschen, um Schleim und Fäkalreste zu entfernen; anschließend wurden die Stücke vorsichtig mit Zelltüchern gesäubert. Um die *iIEL* aus der Darmwand zu lösen, wurden die Stücke 30 min. bei 37°C in einem Erlenmeyerkolben in 50 ml PBS 10 % FCS und 1 mM DTT auf einem Magnetrührer gerührt. Der Überstand wurde bei 4°C mit 225 x g 10 min. zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert und die Zellsuspension auf eine mit PBS befeuchtete Nylon-Säule gegeben, um die Lymphozyten anzureichern. Die Säule bestand aus einer 10 ml Spritze, die mit Nylon-Wolle ca. 2 cm (komprimierter Zustand) gefüllt wurde. Der Säulendurchfluss wurde wiederum zentrifugiert, das Zellpellet in 20 ml 44 % Percolllösung resuspendiert und mit 20 ml 67 % Percolllösung unterschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei *RT* mit 600 x g wurden die obersten 10 ml, in denen sich viele tote Epithelzellen befinden, mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt, die ca. 2 cm breite Interphase mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Nach Präparation der Leukozyten wurden diese mit einer Lebend/Tot Färbung unter dem Mikroskop beurteilt und gezählt. Dazu wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau vermischt und mit Hilfe einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer die Zellzahl bestimmt.

4.3 Kultivierung von Zellen

4.3.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Medien und Zusätze bei 4°C aufbewahrt.

Standardmedium (10 % FCS)

445	ml	RPMI 1640 ³
50	ml	FCS ³
5	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung ³ (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

HD11-Medium (8 % FCS, 2 % Hühner Serum)

445	ml	RPMI 1640 ³
40	ml	FCS ³
10	ml	Hühner Serum (30 min. bei 56°C inaktiviert) ³
5	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung ³

HAT-Medium

360	ml	RPMI 1640 ³
90	ml	Medium 199 ⁷
50	ml	Ultra Low IgG FCS ⁷ (30 min. bei 56°C inaktiviert)
10	ml	Interleukin 6 (<i>IL-6</i>)-haltiger Zellkulturüberstand (aus, mit murinem <i>IL-6</i> transfizierter Zelllinie, von T. Göbel zur Verfügung gestellt)
10	ml	HAT Supplement 50 x ³ (Endkonzentration: 1 x 10 ⁻⁴ M Hypoxanthin, 4 x 10 ⁻⁷ M Aminopterin, 1,6 x 10 ⁻⁵ M Thymidin)
5	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung ³
0,5	ml	Stammlösung β-Mercaptoethanol (s.u.)

HT-Medium

450	ml	RPMI 1640 ³
50	ml	Ultra Low IgG FCS ⁷
10	ml	IL-6
10	ml	HT Supplement 50 x ³ (Endkonzentration: 1×10^{-4} M Hypoxanthin, $1,6 \times 10^{-5}$ M Thymidin)
5	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung ³

Einfriermedium (FCS mit 5 % DMSO)

9,5	ml	FCS ³
0,5	ml	Dimethylsulfoxid (DMSO) ²

bei -20°C aufbewahren.

PBS-EDTA

200	mg	Ethylendiamintetraacetic Acid Tetra-Natrium Hydrat (EDTA) ¹⁹ ($C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4$)
-----	----	---

ad 1000 ml PBS, vor Gebrauch autoklavieren.

Stammlösung β -Mercaptoethanol 50 mM

35	μ l	β -Mercaptoethanol ⁵
----	---------	---------------------------------------

ad 10 ml RPMI 1640³.

Stammlösung ConA

15	mg	Concanavalin A (ConA) ¹
----	----	------------------------------------

ad 10 ml RPMI 1640, in Aliquots von 500 μ l bei -20°C lagern, nach Auftauen den Rest verwerfen.

Stammlösung LPS

10	mg	Lipopolysaccharid (LPS) aus E-coli, lyophilisiert ¹⁹
----	----	---

ad 10 ml Aqua bidest., in Aliquots von 500 μ l bei -20°C lagern.

Stammlösung IFN γ

Rekombinantes Hühner-Interferon γ (IFN γ) aus prokaryotischem Expressionssystem [48], von T. Göbel zur Verfügung gestellt, in Aliquots von 1 ml bei -20°C lagern.

4.3.2 Stimulation von primären Leukozyten

4.3.2.1 Herstellung von unstimulierten und stimulierten Makrophagen

Aus Hühnerblut wurden PBL gewonnen, wie unter Abschnitt 4.2.2 auf S.20 beschrieben. Die Zellen wurden in Standardmedium auf eine Zelldichte von 1×10^7 /ml eingestellt und auf Petrischalen mit \varnothing 100 mm verteilt. Nach 48 Std. Kultivierung bei 40°C waren adhärent wachsende Makrophagen mikroskopisch zu erkennen. Das Kulturmedium wurde abgenommen, die Makrophagen in der Petrischale dreimal mit PBS gewaschen, um Suspensionszellen zu entfernen und mit frischem Standardmedium überschichtet.

Bei LPS-Stimulation wurde dem Standardmedium 1 µg/ml LPS zugefügt und bei INF γ -Stimulation wurde 1 µl rekombinantes Hühner-INF γ pro ml Medium zugegeben. Nach weiteren 24 Std. Kultivierung wurden die Zellen verwendet.

4.3.2.2 Herstellung von ConA stimulierten Leukozyten (Blasten)

Milzleukozyten wurden mit 30 ml RPMI 1640³ (mit 0,5 % FCS³ und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung³) auf eine Zelldichte von 1×10^7 /ml eingestellt und mit 10 µg ConA/ml Medium in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Nach 24 Std. bei 40°C sind semiadhärent wachsende, großblasige Zellen (Blasten) zu erkennen. Das Medium wurde vollständig abgenommen und durch frisches Standardmedium ersetzt. Nach weiteren 48 Std. Kultivierung wurden die Blasten verwendet.

4.3.3 Zelllinien

Zell- linie	Spezies	Zellart	Wachstum	Kultur- medium	Referenz	Verwendung
293T	Mensch	Nieren- fibro- blasten	Adhärenz	Standard	[49]	-Transiente Transfektion -Immunsierung
SP2/0	Maus	Myelom- zellen	Suspension	Standard	[50]	-Fusion
2D8	Huhn	B-Zellen	Suspension	Standard	[51]	-Stabile Transfektion -RT-PCR -Northern Blot -Durchflusszyto- metrie
HD11	Huhn	Makro- phagen	Adhärenz	HD11	[52]	
BM-2	Huhn	Makro- phagen	Adhärenz	HD11	[53]	-RT-PCR -Northern Blot -Durchflusszyto- metrie
RP-9	Huhn	B-Zellen	Suspension	Standard	[54]	
CU68	Huhn	B-Zellen	Suspension	Standard	[55]	
DT-40	Huhn	B-Zellen	Suspension	Standard	[56]	
UG-9	Huhn	T-Zellen	Suspension	Standard	[57]	
855-23	Huhn	T-Zellen	Suspension	Standard	von T. Göbel gestellt	
T16G9	Huhn	NK-Zellen	Suspension	Standard		
JJ1E9	Huhn	NK-Zellen	Suspension	Standard		
HD3	Huhn	Erythro- zyten	Suspension	HD11	[58]	

Tab. 4-1: Beschreibung der verwendeten Zelllinien in Bezug auf die Ursprungsspezies, die Art und das Wachstum der Zellen, die Referenzstelle im Literaturverzeichnis und die Verwendungsart dieser Zelllinie in der vorliegenden Dissertation.

4.3.4 Zellen einfrieren

Die Zellen wurden gezählt und in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml Einfriermedium auf dafür geeignete 2 ml Röhrchen verteilt. Diese wurden in einer Einfrierbox, die zur Hälfte mit Isopropanol gefüllt war, bei -80°C um ca. $1^\circ\text{C}/\text{min}$. heruntergekühlt. Bei -80°C können Zellen bis zu 1 Jahr gelagert werden, zur langfristigen Lagerung empfiehlt sich flüssiger Stickstoff.

4.3.5 Zellen auftauen

Dazu wurden die Zellen im Röhrchen in einem 37°C Wasserbad schnellstmöglich aufgetaut und mit ca. 50 ml RT warmen PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche gegeben.

4.3.6 Zellen kultivieren

Von adhären wachsenden Zellen wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen, einmal mit PBS gewaschen, mit ca. 3-5 ml 37°C warmen PBS-EDTA überschichtet und 10 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS durch Zentrifugation gewaschen, gezählt und in der gewünschten Dichte in Kulturmedium resuspendiert. Suspensionszellen wurden gezählt und durch Zentrifugation bzw. Verdünnung mit Kulturmedium in der gewünschten Dichte weiterverwendet.

4.4 DNA-Präparation

Zur genomischen Analyse wurde DNA aus Hühner-Erythrozyten gewonnen. Dabei wurde 100 µl Vollblut in 2,9 ml PBS verwendet und mit Hilfe des **Genomic DNA Kit**¹⁵ nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und 250 ng DNA in der PCR verwendet (siehe Abschnitt 4.6.2.2, S.29).

4.5 RNA-Präparation

Um Gesamt-RNA aus Zellen zu gewinnen, wurde TRIZOL® Reagenz, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat, verwendet. Dadurch wurden die Zellen zerstört, die Integrität der RNA blieb jedoch erhalten. Durch Zugabe von Chloroform wurde die organische und die wässrige Phase getrennt und die RNA durch Präzipitation der wässrigen Phase gewonnen.

Beim Arbeiten mit RNA ist grundsätzlich immer an die Gefahr zu denken, dass ubiquitär vorkommende RNasen die RNA degradieren. Man sollte nur mit RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen arbeiten. Geräte und Gegenstände werden mit 3 % H₂O₂ für ca. 1 Std. inkubiert und anschließend mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser, s.u.) abgewaschen oder werden nach Eintauchen in 96 % Ethanol abgeflammt.

4.5.1 Material

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Reagenzien bei RT gelagert.

TRIZOL® Reagenz⁷

bei 4°C aufbewahren.

Chloroform ad analysis¹⁰**Isopropanol**¹⁰**DEPC-Wasser**

1 ml Diethylpyrocarbonat (*DEPC*)¹⁹

ad 1000ml Aqua dest., 1 Std. bei 37°C inkubieren, autoklavieren.

70 % Ethanol

70 ml Ethanol reinst¹⁰

30 ml DEPC-Wasser

4.5.2 Durchführung

5 x 10⁷ bis 1 x 10⁸ Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 225 x g pelletiert und in 1 ml TRIZOL® mit Hilfe einer auf eine Spritze aufgesetzten 20G Kanüle resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt, kurz geschüttelt, 2 min. bei RT inkubiert und dann 15 min. bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige, RNA-haltige Schicht wurde in ein neues Röhrchen überführt, 500 µl Isopropanol dazupipettiert, kurz geschüttelt, 10 min. bei RT, 30 min. bei -20°C inkubiert und anschließend 10 min. bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttelt, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nochmals 5 min. bei 4°C mit 7500 x g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und betrug je nach Zellart 200-500 ng/µl.

4.6 RT-PCR**4.6.1 cDNA Synthese durch reverse Transkription (RT)**

Die in der Gesamt-RNA enthaltene messenger-RNA (*mRNA*) wurde durch eine rekombinante aviäre reverse Transkriptase in komplementäre DNA (*cDNA*) umgeschrieben, die dann als Matrize in der Polymerase Ketten Reaktion diente.

Es wurde das **ThermoScript™ RT-PCR System**⁷ verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde am Ende mit Wasser¹⁹ auf ein Volumen von 100 µl gebracht.

4.6.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Bei der PCR wird durch eine hitzeresistente DNA Polymerase mit Hilfe von spezifischen Primern eine bestimmte cDNA Sequenz amplifiziert. Dabei wird das PCR-Reaktions-Gemisch mit Hilfe eines Thermocyclers auf 96°C für 5 sec. erhitzt, um die cDNA zu denaturieren und anschließend 30 sec. bei der Primer-spezifischen Temperatur inkubiert, damit die Primer an der passenden Sequenz der cDNA binden können. Dann folgt eine 2-minütige Inkubation mit einer Polymerase-spezifischen Temperatur (bei Taq und Herculase DNA Polymerase jeweils 72°C), bei der der komplementäre DNA Strang synthetisiert wird. Diese drei Schritte werden 35-mal wiederholt. Am Ende wird die Reaktion noch einmal 10 min. bei der Polymerase-spezifischen Temperatur inkubiert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

4.6.2.1 Material

Alle Reagenzien wurden bei -20°C aufbewahrt.

TaqDNA Polymerase⁹

10 x PCR Puffer mit 15 mM MgCl₂⁹

Herculase® Enhanced DNA Polymerase²⁰

Die Herculase wurde für PCR mit anschließender Klonierung in Expressionsvektoren verwendet, da diese DNA Polymerase über eine sog. proof-reading Eigenschaft verfügt. Das heißt, während der DNA Synthese kontrolliert sie selbst, ob die richtigen Basen angebaut worden sind und bessert sie gegebenenfalls aus.

10 x Herculase Puffer²⁰

Primer 100 pmol/ μ l¹¹

Primer (Orientierung)	Sequenz	Enzym-schnittstelle	Temp. (°C)
17 (s)	TACCACAATGTACCCTGGC		55
18 (as)	CTCGTCTTGTTTTATGCGC		55
453 (as)	AAGCCATTTAATCTCTTGCCCACC		60
455 (as)	AGCGGGTCCCCGCGTTCC		55
474 (s)	GGATCCATCATGGCACCAATGGC CGTGGCCCTC		60
475 (as)	AGGATCCCCCAGCTGGGCGTAGAT		60
476 (as)	AGGATCCCCTGTGGTGTAGATGA CAGG		60
485 (as)	CCAGCGCGGTAAATCAGTGC		55
488 (s)	CGGAATTCCAGCAACTGCCCCGACC	EcoRI	60
489 (as)	CGGAATTCTAAGGATCCCCCAGCTG mit Stopp Codon	EcoRI	60
498 (as)	CCCCCGTACGGCCACCTC		60
509 (as)	GAATTCTAAATCCCTTCCCCACCCAG mit Stopp Codon	EcoRI	60
547 (s)	GAATTCATGGCACCAATGGCCGT	EcoRI	55
548 (as)	GAATTCACCAGGCTCCCACG	EcoRI	55
549 (as)	GAATTCATGGGACCACTCCTTGGC	EcoRI	55
550 (s)	GAATTCAGCAACTGCCCAA	EcoRI	55
551 (as)	GAATTCTCAGCGCGGTAAATCAGT mit Stopp Codon	EcoRI	55
556 (as)	AATCCCTTCCCCACCCAGACT		60
573 (as)	GAATTCACAGGACACCAACTCAGC	EcoRI	55
574 (as)	GCACACCGAGCACACTGGCAC		60

Tab. 4-2: Aufstellung der in der PCR verwendeten Primer¹¹.**4.6.2.2 Durchführung**

2,8	μ l	Wasser ¹⁹
1,5	μ l	10 x Puffer
1,5	μ l	ddNTP Set 20 mM ⁹ , Endkonzentration: 2 mM
3,0	μ l	Primer sense (s), Endkonzentration: 20 mM
3,0	μ l	Primer antisense (as), Endkonzentration: 20 mM
0,2	μ l	DNA Polymerase, Endkonzentration: 1 Unit

Aus diesen Reagenzien wurde ein Mastermix angesetzt und anschließend 3 μ l der gewünschten cDNA oder 3 μ l Wasser¹⁹ als Negativkontrolle dazu pipettiert. Bei der Verwendung eines Plasmids als Matrize wurde dieses zuvor 1:1000 in Wasser¹⁹ verdünnt.

Die verschiedenen Ansätze wurden im Thermocycler auf die oben beschriebenen Temperaturen automatisch aufgeheizt bzw. abgekühlt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

4.7 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Diese Technik wird angewendet, wenn nur ein Teilstück einer Gensequenz, z. B. durch Datenbankanalysen, bekannt ist. Um die DNA Sequenz am 5' oder am 3' Ende dieser Sequenz zu erhalten, wird folgendermaßen vorgegangen: mRNA einer Gewebeart, die dieses Gen exprimiert, wird in doppelsträngige cDNA umgeschrieben, diese mit Adaptorsequenzen verbunden und in einer PCR als Matrize verwendet. Bei sog. 3' RACE werden die Primer so gewählt, dass der sense Primer am 3' Ende der bekannten Gensequenz bindet und der antisense Primer in der am 3' Ende gelegenen Adaptorsequenz. Das PCR Produkt wird in einen bakteriellen Vektor kloniert, vermehrt und die Sequenz analysiert (vgl. Abschnitt 4.9 und 4.10)

4.7.1 Material und Durchführung

Die doppelsträngige cDNA wurde mit dem **Marathon™ cDNA Amplification Kit** der Fa. Clontech, Palo Alto, USA aus mRNA von iIEL durch T. Göbel hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die PCR wurde mit den in der Tabelle genannten Primern durchgeführt; wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben.

Primer (Orientierung)	Sequenz	Temp. (°C)
500 (s)	TCGGGGGCTGCCTTCTGTTC	65
501 (s)	TCTGAGTCAGAGGACGTATCAGTGATG	55
66 AP-1 (as)	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	65

Tab. 4-3: Aufstellung der in der 3'RACE-PCR verwendeten Primer.

4.8 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kann die Größe von DNA Stücken bestimmt werden, wenn diese in einer relativ großen Menge, wie sie z. B. bei der PCR entsteht, vorliegen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung werden die Stücke der Länge nach aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenzgröße dient ein ebenso aufgetragener und gefärbter Marker.

4.8.1 Material

EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

186,1 g EDTA Di-Natrium Dihydrat ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$)¹⁹
20,0 g Natriumhydroxid (NaOH)¹⁰

ad 700 ml Aqua dest., pH 8, 0 mit NaOH einstellen, bei RT lagern.

0,5 x TBE Puffer

54,0 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan¹⁰
27,5 g Borsäure¹⁰
20,0 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

ad 10 l Aqua dest., bei RT lagern.

1 % Agarose

0,5 g Agarose²
50 ml 0,5 x TBE Puffer

vor Gebrauch ansetzen.

6 x Loading Dye Solution (Ladepuffer)⁹

GeneRuler™100bp DNA Ladder plus⁹

Ethidiumbromid Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid¹⁹

ad 1 ml Aqua dest., bei 4°C aufbewahren.

Zum Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 in Aqua dest. verdünnt.

4.8.2 Durchführung

Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde die 1 % Agarose verflüssigt, anschließend auf 50°C abgekühlt und in eine Elektrophoresekammer mit Probenaschenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 0,5 x TBE Puffer überschichtet. 5 µl des PCR-Reaktions-Gemisches wurden mit 1 µl 6 x Loading Dye Solution (mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylen Cyanol FF) vermischt und in die vorhandenen Vertiefungen des Agarosegels pipettiert. Durch die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe konnte das aufgetragene Gemisch während der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar

gemacht werden. Es wurde solange eine konstante Spannung von 120 V angelegt, bis die Proben ausreichend weit im Gel gewandert sind und das Gel anschließend in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung 30 min. unter Schwenken gefärbt. Die aufgetrennte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

4.9 TA-Klonierung und Plasmidaufreinigung

4.9.1 Material

pcDNA3.1/V5-His©TOPO® TA Expression Kit⁷

mit chemokompetenten TOP 10 E-coli und SOC Broth Medium

LB-Agar

25	g	Luria Broth Base ⁷
15	g	Agar ¹⁹

ad 1000ml Aqua dest., auf pH 7,2 einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern.

LB-Medium

25	g	Luria Broth Base ⁷
----	---	-------------------------------

ad 1000ml Aqua dest., auf pH 7,2 einstellen, autoklavieren, bei 4°C lagern.

Ampicillin 50 mg/ml

500	mg	Ampicillin ¹⁹
-----	----	--------------------------

ad 10 ml Aqua bidest., in Aliquots von 500µl bei -20°C lagern.

NucleoSpin®Plasmid Kit⁸

4.9.2 Durchführung

Um PCR-Produkte zu exprimieren bzw. zu sequenzieren, wurden diese mit Hilfe des pcDNA3.1/V5-His©TOPO® TA Expression Kit nach Anleitung des Herstellers kloniert. Die A-Überhänge am 3' Ende des PCR-Produkts, wie sie durch die DNA Polymerase entstehen, wurden durch eine Topoisomerase mit den T-Überhängen des Vektors verbunden (siehe Abb. 4-1, S.33).

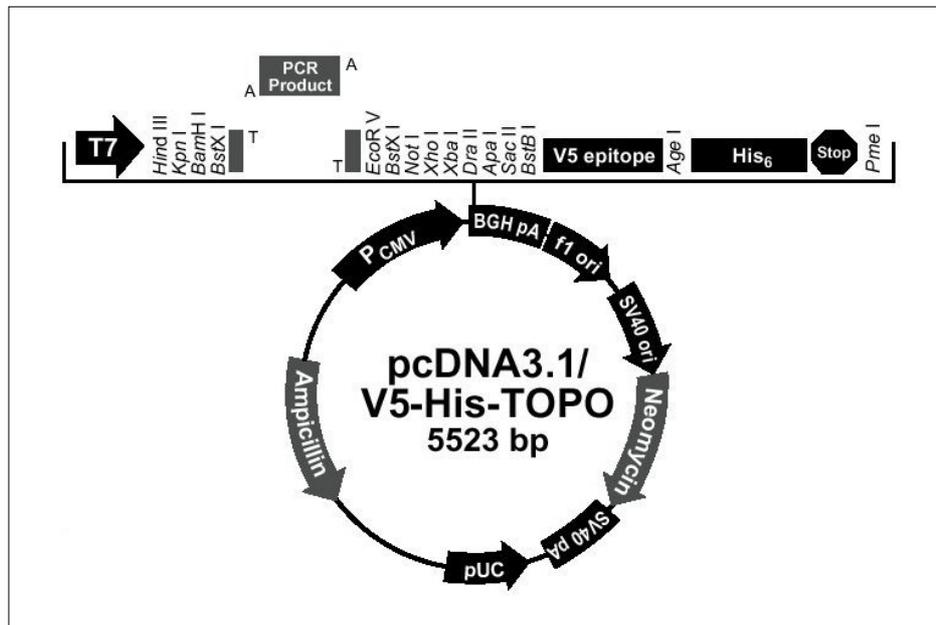


Abb. 4-1: pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor mit genauer Beschreibung der Multiple Cloning Site. Der Vektor führt in Prokaryoten zu Ampicillin- in Eukaryoten zu Neomycin-Resistenz.

Anschließend erfolgte eine Transformation des Plasmids in chemokompetente TOP 10 E-coli und Ausplattierung dieser auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsantibiotikum. Die Platte wurde 24 Std. bei 37°C bebrütet und die entstandenen Kolonien durch PCR getestet. Die positiven Kolonien wurden über Nacht in 5 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin vermehrt, das Plasmid mit dem NucleoSpin®Plasmid Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt. Das Plasmid wurde zur Sequenzanalyse, zum Restriktionsenzymverdau und als Matrize für PCR weiterverwendet.

4.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde durch die Firma GATC, Konstanz durchgeführt. Die gewünschten Plasmide wurden in einer Konzentration von 200 ng/µl dorthin geschickt; die Sequenzdaten konnten 3 Tage später über das Internet unter www.my-gatc.de heruntergeladen werden.

4.11 Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung

Restriktionsenzyme sind rekombinant hergestellte Endonukleasen, die bestimmte Nukleotidsequenzen (sog. Palindrome) erkennen und an diesen Stellen den DNA Strang schneiden.

Werden verschiedene Plasmide mit dem gleichen Enzym geschnitten, können diese durch Ligation in unterschiedlicher Kombination wieder miteinander verbunden werden.

4.11.1 Durchführung

Zum Beispiel:

2,0	µl	Plasmid
1,0	µl	10 x Puffer (enzymspezifisch) ⁹
0,5	µl	Restriktionsenzym ⁹
6,5	µl	Wasser ¹⁹

Der Ansatz wurde eine Std. bei 37°C inkubiert, auf Agarosegel aufgetragen, mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht, wie in Abschnitt 4.8, S.30 beschrieben. Mit Hilfe eines Skalpell wurde das Fragment in der gewünschten Länge herausgeschnitten, die DNA mit dem **QIAquick Gel Extraction Kit**¹⁵ nach Herstellerangaben aufgereinigt und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt.

4.12 Ligation

4.12.1 Vorbereitung

Die Vektoren für die Ligation lagen bereits vor, wie in den Abb. 4-2 und 4-3 beschrieben.

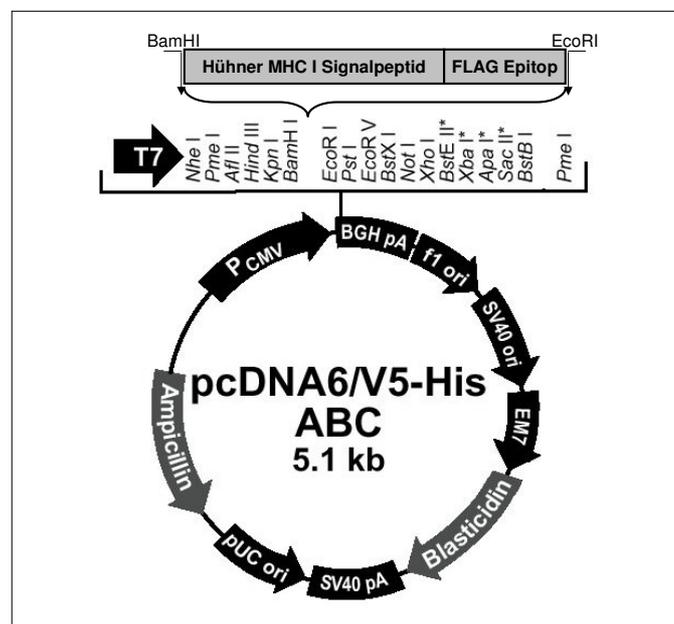


Abb. 4-2: Modifizierter pcDNA6/V5-His A Vektor mit der Sequenz für das Signalpeptid von Hühner MHC I Molekül und für ein N-terminal lokalisiertes FLAG Epitop. Der Vektor dient zur Expression von CHIR mit einem am extrazytoplasmatischen Ende lokalisiertem FLAG Epitop (FLAG-Konstrukt). Er führt in Prokaryoten zu einer Ampicillin- und in Eukaryoten zu einer Blasticidin-Resistenz.

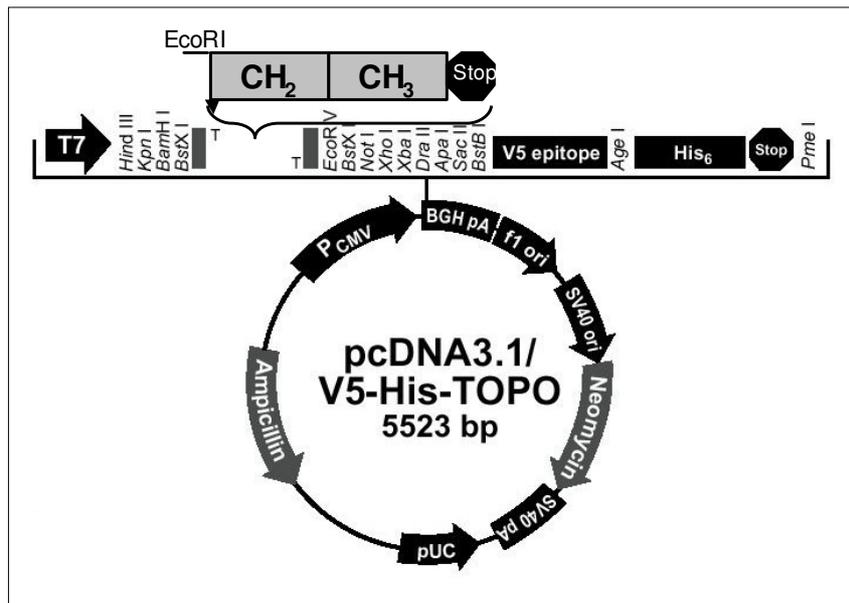


Abb. 4-3: Modifizierter pcDNA3.1/V5-His TOPO Vektor mit der Sequenz von CH₂ und CH₃ Ig-Domänen der schweren Kette (F_c-Fragment) des humanen IgG Moleküls und Stop Codon. Der Vektor dient zur Expression von löslichen, in den Überstand sezernierten Konstrukten aus dem extrazytoplasmatischen Bereich des CHIR und dem F_c-Fragment (huIg-Konstrukt).

Zur Herstellung des gewünschten Inserts wurde eine PCR mit den in Tab. 4-4 aufgelisteten Primern durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde TA-kloniert (siehe Abschnitt 4.9, S.32), ebenso wie die in Abb. 4-2 und 4-3 beschriebenen Vektoren mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und aus dem Agarosegel aufgereinigt (vgl. Abschnitt 4.11, S.33)

Rezeptor	Primerkombination für FLAG-Konstrukt	Primerkombination für huIg-Konstrukt
CHIR-B2	488/489	547/548
CHIR-A2	488/509	547/573
CHIR-AB1	550/551	547/549

Tab. 4-4: Auflistung der für die Herstellung der FLAG-Konstrukte und huIg-Konstrukte verwendeten Primerkombinationen. Die Sequenzen dieser Primer sind in Tab. 4-2, S.29 aufgeführt. Die genaue Lokalisation der Primer ist in den Abb. 5-2, 5-3 und 5-4, S.67, 68 und 69 zu sehen.

4.12.2 Material

Quick Ligation™ Kit ¹²

4.12.3 Durchführung

Die Ligation von EcoRI geschnittenem Vektor und Insert erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ligationsprodukt wurde anschließend, wie in Abschnitt 4.9.2, S.32 beschrieben, in chemokompetente E-coli transformiert, diese mit PCR getestet, vermehrt und das Plasmid aufgereinigt.

4.13 Transfektion von eukaryotischen Zellen

In der vorliegenden Dissertation wurden ausschließlich liposomale Transfektionsreagenzien verwendet. Bei dieser Methode bindet die positiv geladene Oberfläche von polykationischen Liposomen sowohl negativ-geladene DNA-Moleküle, als auch die negativ geladene Zelloberfläche. Der Liposomen/Polynucleotid-Komplex wird in die Zelle aufgenommen und das Gen exprimiert. Die Art des Transfektionsreagenz und die Effizienz hängen von der jeweiligen Zellart ab.

4.13.1 Transiente Transfektion von 293T-Zellen

293T-Zellen wurden für die Expression von FLAG- und huIg-Konstrukten (vgl. Abschnitt 4.12, S.34) verwendet.

4.13.1.1 Material

MetafecteneTM⁴

RPMI 1640³

4.13.1.2 Durchführung

$3,8 \times 10^6$ Zellen wurden in 14 ml Standardmedium in eine Petrischale mit Ø 100 mm gesät und 5 Std. bei 37°C inkubiert, um die Zellen adhären zu lassen. In einem sterilen Polypropylen-Röhrchen wurden 15 µg Plasmid in 500 µl RPMI 1640 gelöst, in einem zweiten Röhrchen 70 µl Metafectene in 430 µl RPMI 1640. Beides wurde miteinander vermischt, 15 min. bei RT inkubiert und tropfenweise auf die adhären Zellen gegeben. Nach 24 bis 48 Std. Inkubation bei 37°C wurden die Zellen analysiert.

4.13.2 Stabile Transfektion von 2D8-Zellen

2D8-Zellen wurden für die stabile Expression von CHIR-B2-FLAG-Konstrukt (vgl. Abschnitt 4.12, S.34) verwendet.

4.13.2.1 Material

DOSPER Liposomales Transfektionsreagenz ¹⁶

HEPES 1 M

11,91 g HEPES (Hydroxyethyl-piperazin-ethan-sulfonsäure) ²
ad 50 ml Aqua bidest., bei 4°C lagern.

Hepes gepufferte Salzlösung (HBS)

876 mg Natriumchlorid (NaCl) ²
2 ml HEPES 1 M

ad 100 ml Aqua bidest., auf pH 7,4 einstellen und mit einem 0,22 µm Filter steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren.

Blasticidin Stammlösung 10 mg/ml

100 mg Blasticidin S Hydrochlorid ¹⁹
ad 10 ml steriles PBS, steril filtrieren und in Aliquots von 200 µl bei -20°C lagern.

Selektionsmedium (7,5 µg/ml Blasticidin)

20 ml Standardmedium
15 µl Blasticidin Stammlösung

vor Gebrauch ansetzen.

4.13.2.2 Transfektion

0,6 x 10⁵ Zellen wurden in 500 µl Standardmedium in eine Delle einer 24-Lochplatte gesät und anschließend transfiziert. Dazu wurde in einem sterilen Polypropylen-Röhrchen 1,2 µg Plasmid in 50 µl HBS gelöst. In einem zweiten Röhrchen wurde 12 µl DOSPER zu 38 µl HBS gegeben. Beides wurde miteinander vermischt, 15 min. bei RT inkubiert, tropfenweise auf die Zellsuspension gegeben und diese 24 Std. bei 40°C inkubiert.

4.13.2.3 Stabile Selektion

Nach 24 Std. Inkubation wurden die Zellen in 20 ml Selektionsmedium resuspendiert und auf eine 96-Lochplatte verteilt. Nach ca. 2 Wochen waren die ersten stabilen Klone zu erkennen und wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 4.15, S.43) analysiert.

4.13.3 Stabile Transfektion von HD11-Zellen

HD11-Zellen wurden für die stabile Expression von CHIR-A2- und CHIR-AB1-FLAG-Konstrukt (vgl. Abschnitt 4.12, S.34) verwendet.

4.13.3.1 Material

FuGENE 6 Transfektionsreagenz¹⁶

RPMI 1640³

4.13.3.2 Durchführung

3×10^6 Zellen wurden in 1 ml HD11-Medium in eine Delle einer 24-Lochplatte am Vortag ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde das Kulturmedium durch 500 µl frisches HD11-Medium ersetzt. In ein steriles Röhrchen wurden 2 µl Fugene zu 98 µl RPMI 1640 pipettiert, 0,75 µg Plasmid dazugegeben und 15 min. bei RT inkubiert. Die Mischung wurde tropfenweise auf die Zellen geben und diese nach 24 Std. stabil selektiert, wie in Abschnitt 4.13.2.3 beschrieben.

4.14 Northern Blot

Diese Technik dient zum Nachweis einer spezifischen mRNA-Sequenz in der Gesamt-RNA einer Zellart, um das Expressionsmuster eines Gens zu ermitteln. Die RNA wird der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer radioaktiv markierten, spezifischen Sonde hybridisiert. Bindet die Sonde an die mRNA auf der Membran, wird dadurch ein Röntgenfilm auf Höhe der spezifischen mRNA geschwärzt.

4.14.1 Elektrophorese und Transfer der RNA auf Nylonmembran

Es wurde ein Agarosegel mit MOPS Puffer und 3,7 % Formaldehyd verwendet, um die RNA aufzutrennen. Bis zu dem Zeitpunkt, wo die RNA durch das Formaldehyd im Gel denaturiert

wurde, mussten Vorsichtsmaßnahmen gegen RNasen ergriffen werden, wie bereits in Abschnitt 4.4, S.26, beschrieben.

4.14.1.1 Material

DEPC-Wasser

siehe Abschnitt 4.5.1, S.26

10 x MOPS Puffer

25,12 g	MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) ²
2,46 g	Natrium Acetat (C ₂ H ₃ O ₂ Na) ¹⁹
2,22 g	EDTA Di-Natrium Dihydrat (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ x 2H ₂ O) ¹⁹

ad 600 ml DEPC-Wasser, auf pH 7,0 einstellen und bei 4°C lagern.

1,2 % Agarosegel

160 ml	DEPC-Wasser
2,4 g	Agarose ²
20 ml	10x MOPS Puffer
20 ml	Formaldehyd 37 % ¹⁹

Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in DEPC-Wasser gelöst und auf 50°C abgekühlt. Unter dem Abzug wurden MOPS Puffer und Formaldehyd zugegeben und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 10er Probenaschenkamm gegossen.

Elektrophorese-Laufpuffer

1300 ml	DEPC-Wasser
160 ml	10x MOPS
140 ml	Formaldehyd 37 % ¹⁹

vor Gebrauch ansetzen.

20 x Probenpuffer

32 mg	Bromphenolblau ¹⁹
32 mg	Xylencyanol ¹⁹
2 ml	Glycerol RNase frei ¹⁹
2 ml	DEPC-Wasser

in Aliquots von 50 µl bei -20°C lagern.

deionisiertes Formamid

10	ml	Formamid ²
0,5	g	AG®-501-X8 Granulat (Kationenaustauscher) ⁵

1 Std. zusammen rotieren, Granulat absetzen lassen, Überstand in 500 µl Aliquots bei -20°C lagern.

RNA-Ladepuffer

500	µl	deionisiertes Formamid
250	µl	DEPC-Wasser
100	µl	Formaldehyd 37 % ¹⁹
100	µl	10x MOPS Puffer
50	µl	20x Probenpuffer
5	µl	Ethidiumbromid Stammlösung (siehe Abschnitt 4.8.1, S.31)

vor Gebrauch ansetzen.

20 x SSC-Lösung

175,3	g	Natriumchlorid (NaCl) ²
88,2	g	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ¹⁰

ad 1000 ml Aqua bidest, auf pH 7,0 einstellen und bei RT lagern, bei Bedarf auf 10 x SSC-Lösung mit Aqua bidest. verdünnen.

HybondTMN, Nylon Membran ¹**Filterpapier Nr. 3 ²⁴****4.14.1.2 Durchführung**

Pro Gewebe- bzw. Zellart wurden 20 µg RNA, hergestellt, wie in Abschnitt 4.4, S.26, beschrieben, und in einer Vakuumzentrifuge zu einem RNA-Pellet konzentriert. Dieses wurde in 20 µl RNA-Ladepuffer resuspendiert, 5 min. bei 65°C erhitzt und in die jeweiligen Vertiefungen des Agarosegels gegeben. Es wurde eine konstante Spannung von 100 V angelegt, die nach 10 min. auf 50 V reduziert wurde. Nach 5 - 6 Std. Laufzeit wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, zugeschnitten und 30 min. in 20 x SSC-Lösung gewaschen. Über Nacht wurde die im Gel aufgetrennte RNA durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran geblottet, wie in Abb. 4-4 auf S.41 beschrieben.

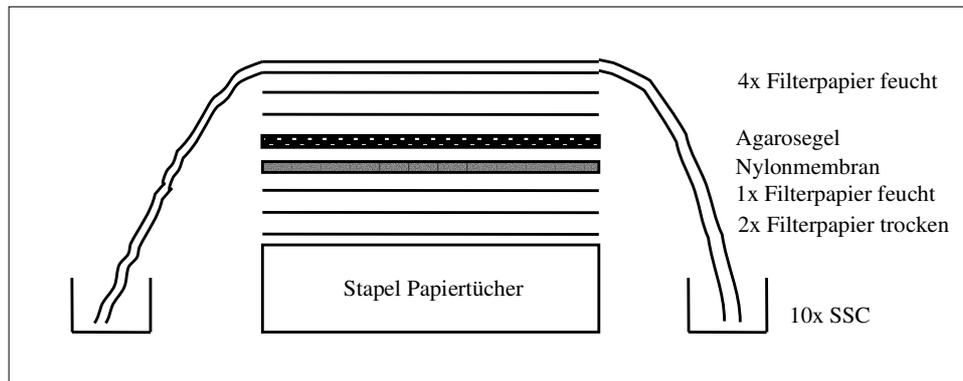


Abb. 4-4: Schematische Darstellung des Kapillarblottens. Alle dargestellten Komponenten wurden in der Größe des Agarosegels zugeschnitten. Die obersten zwei Filterpapiere waren ca. 4 x so lang wie das Gel. Das Filterpapier und die Nylonmembran wurden kurz in 10 x SSC-Lösung eingelegt. Der gesamte Blot wurde am Ende mit Frischhaltefolie zum Schutz vor Verdunstung umhüllt.

Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wurde diese durch UV-Licht Bestrahlung kreuzvernetzt. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Membran, in Plastikfolie eingehüllt, bei -20°C gelagert.

4.14.2 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Eine DNA Polymerase synthetisiert mit Hilfe von sog. Random-Primern, das sind kurze Oligonukleotide aller möglichen Sequenzkombinationen, in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Adenosin, einen zur cDNA Matrize komplementären, radioaktiv markierten DNA-Strang. Für die Herstellung der Matrize wurde die gewünschte DNA-Sequenz durch Verdau mit dem Restriktionsenzym BstXI aus dem jeweiligen Plasmid geschnitten (siehe Abschnitt 4.11, S.33). Als Positivkontrolle diente die DNA-Sequenz eines sog. House-keeping-genes, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (*GPDH*), das von T. Göbel zur Verfügung gestellt wurde.

Beim Umgang mit dem Radionuklid ^{32}P , ein reiner Beta-Strahler mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen und einer relativ hohen Beta-Energie, sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen. Das gebräuchliche Abschirmmaterial war 1 cm dickes Plexiglas zum Schutz von Augen und Körper, außerdem wurden Handschuhe getragen.

4.14.2.1 Material

High Prime DNA Labeling Kit¹⁶

mini Quick Spin Columns¹⁶

Redivue deoxyadenosine 5' [α ^{32}P]-triphosphat, triethylammonium salt; 3000Ci/mmol¹
(^{32}P markiertes Adenosin)

Salmon Sperm DNA, 10 mg/ml¹⁹

4.14.2.2 Durchführung

50 ng DNA wurden mit dem High Prime DNA Labeling Kit nach Anleitung des Herstellers mit ^{32}P -Adenosin markiert und mit mini Quick Spin Columns aufgereinigt. Nach Zugabe von 100 μl Salmon Sperm DNA, um unspezifische Bindungsstellen auf der Nylonmembran zu blockieren, konnte die Sonde für die Hybridisierung verwendet werden.

4.14.3 Hybridisierung

Durch Inkubation der Sonde mit der auf der Nylonmembran fixierten RNA können diese miteinander hybridisieren. Die unspezifisch auf der Membran gebundene Sonde wird durch Waschen in Salzlösungen mit absteigender Salzkonzentration entfernt. Die Bindung zwischen Sonde und mRNA ist umso spezifischer, je niedriger die Salzkonzentration und je höher die Temperatur ist.

4.14.3.1 Material

QuikHyb® Hybridization Solution²⁰

20 % SDS Stammlösung

20 g Natriumdodecylsulfat (SDS)⁵

ad 100 ml Aqua bidest, bei RT lagern.

Waschlösungen	20 x SSC	20 % SDS	Aqua bidest.
3 x SSC/0,1 % SDS	75 ml	2,5 ml	422,5 ml
1 x SSC/0,1 % SDS	25 ml	2,5 ml	472,5 ml
0,3 x SSC/0,1 % SDS	7,5 ml	2,5 ml	490 ml
0,1 x SSC/0,1 % SDS	2,5 ml	2,5 ml	495 ml

Kodak BioMax MR (Röntgenfilm)¹

4.14.3.2 Durchführung

Die in Abschnitt 4.14.1 hergestellte Nylonmembran wurde kurz in Aqua dest. gewaschen und zusammen mit 10 ml vorgewärmter QuikHyb-Hybridisierungslösung in einer rotierenden Glasflasche im Hybridisierungs-ofen bei 60°C 1 Std. vorinkubiert. Anschließend wurde die in Abschnitt 4.14.2 synthetisierte Sonde dazugegeben und 2 Std. bei 60°C hybridisiert. Die Waschlösungen wurden auf 60°C aufgewärmt und die Membran mit 3 x SSC/0,1 %SDS-, 1 x SSC/0,1 %SDS- bzw. 0,3 x SSC/0,1 %SDS-Lösung jeweils zweimal bei 60°C 10 min. gewaschen. Nach dem letzten, 90-minütigen Waschschriff mit 0,3 x SSC/0,1 %SDS-Lösung bei 65°C wurde die Membran in Plastikfolie gehüllt, in eine Röntgenkassette mit Verstärkerfolien geklebt und der eingelegte Röntgenfilm 24 Std. bei -80°C belichtet. Die Membran konnte durch sog. Stripping wiederverwendet werden. Dabei wurde die spezifisch gebundene Sonde durch mehrfaches Überschütten mit kochender 0,1 x SSC/0,1 %SDS-Lösung vollständig abgewaschen.

4.15 Durchflusszytometrie

Um die Expression von Zelloberflächenantigenen zu untersuchen - dies wird als Immunphänotypisierung bezeichnet - wird der Fluorescence-Activated-Cell-Scanner (*FACScan*) verwendet. An diese Antigene binden spezifische mAk, die mit einem sekundären, Fluorochrom-markierten Antikörper detektiert werden. Die Zellen passieren anschließend einzeln einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dabei werden das Streulicht und das nach Anregung emittierte Licht von einem Photomultiplier in elektrische Impulse umgewandelt, verstärkt und digital im Computer dargestellt. Das Streulicht gibt Aufschluss über die Größe (forward scatter (*FSC*)) und die Granularität (sideward scatter (*SSC*)) der Zelle, die spezifisch für die verschiedenen Zellarten sind. Das durch Anregung der Fluorochrome Fluorescein-Iso-Thiocyanat (*FITC*, messbar im FL-1 Kanal) bzw. Phycoerythrin (*PE*, FL-2 Kanal) emittierte Licht gibt an, welche Antigene auf der Zelloberfläche vorhanden sind.

4.15.1 Material

10 % Natriumazid

10 g Natriumazid (NaN_3)¹⁰

ad 100 ml PBS, bei RT lagern.

Fluo Puffer (1 % BSA, 0,01 % NaN₃)

10 g Bovines Serumalbumin (BSA)
 1 ml 10 % Natriumazid

ad 1000 ml PBS, bei 4°C lagern.

Primäre Antikörper

Antikörper	Bindet Oberflächen-antigen (Spezifität)	Isotyp	Verdünnung	Referenz
L-Kette ¹⁷	IgL-Kette (B-Zellen)	IgG ₁	Überstand	[59]
AV20	Bu-1 (B-Zellen)	IgG ₁	2µg/ml	[60]
CT3	CD3 (T-Zellen)	IgG ₁	Überstand	[61]
28-4	? (CD3 ⁻ CD8 ⁺ iIEL)	IgG ₃	Überstand	[62]
8F2	CD11c/CD18 (?) (Makrophagen)	IgG ₁	Überstand	[63]
3H7	CHIR-B2	IgG _{2b}	Überstand	Im Rahmen dieser Diss. hergestellt
8D12	CHIR-AB1	IgG _{2a}	Überstand	
Anti-FLAG M2 ¹⁹	FLAG-Epitop	IgG ₁	1:200	Fa. Sigma

Tab. 4-5: Aufstellung der für die Durchflusszytometrie verwendeten primären Antikörper.

Sekundäre Antikörper

goat-anti-mouse-Ig (H+L)-FITC¹⁷, 1:50

goat-anti-mouse-IgG₁-FITC¹⁷, 1:50

goat-anti-mouse-IgG_{2a}-FITC¹⁷, 1:50

goat-anti-mouse-IgG_{2b}-FITC¹⁷, 1:50

goat-anti-mouse-IgG₃-FITC¹⁷, 1:50

goat-anti-mouse-IgG₁-PE¹⁷, 1:300

goat-anti-mouse-IgG₃-PE¹⁷, 1:300

Streptavidin-FITC¹⁷, 1:50

jeweils in der angegebenen Konzentration mit Fluo Puffer verdünnen.

4.15.2 Durchführung

In die Vertiefung einer 96-Rundlochplatte wurden 5 x 10⁵ Zellen pipettiert, diese durch Zentrifugation bei 716 x g pelletiert und bei einer Einfachfärbung 20 min. mit 30 µl des

gewünschten primären Antikörpers auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl Fluo Puffer durch Zentrifugation gewaschen und mit 30 µl verdünntem sekundärem Antikörper, meist goat-anti-mouse-Ig (H+L)-FITC, für 20 min. auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese zusammen mit 200 µl Fluo Puffer in geeignete Proben-Röhrchen überführt, im FACScan gemessen und anschließend mit dem Computerprogramm CellQuest™ analysiert.

Sollten zwei verschiedene Oberflächenantigene gleichzeitig angefärbt werden (Doppelfärbung), wurden beide primären Antikörper bzw. die isotypenspezifischen sekundären Antikörper jeweils zusammen inkubiert.

4.16 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Produktion eines mAk wird die Fähigkeit eines lebenden Organismus (Maus) genutzt, auf die wiederholte Antigenstimulation (Immunisierung) mit der Produktion von spezifischen Antikörpern durch B-Zellen zu reagieren. Um den spezifischen Antikörper zu gewinnen, werden die Lymphozyten der Maus mit Myelomzellen, die einen Enzymdefekt besitzen, vereinigt (Fusion) und auf diejenigen Hybridomzellen selektiert, die den spezifischen Antikörper produzieren (Screening).

4.16.1 Immunisierung

293T-Zellen wurden in 2 Petrischalen, wie in Abschnitt 4.13.1, S.36 beschrieben, mit dem CHIR-FLAG-Konstrukt (siehe Abschnitt 4.12, S.34) transient transfiziert. Nach 48 Std. wurden diese abgelöst, die Expression durch Immunphänotypisierung mit dem Anti-FLAG Antikörper (siehe Abschnitt 4.15, S.43) kontrolliert, gezählt und 1×10^7 Zellen in 200 µl PBS intraperitoneal in eine Balb/c Maus gespritzt. Dieser Vorgang wurde nach drei und sechs Wochen wiederholt.

4.16.2 Fusion

Myelomzellen können mit Lymphozyten fusioniert werden, indem den Zellen im engen Kontakt zueinander durch Polyethylenglykol Wasser entzogen wird und sich daraufhin die Zellmembranen vereinigen.

SP2/0 Zellen fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*HGPRT*), das zum Wachstum in HAT-Medium notwendig ist. Lymphozyten besitzen keinen

Enzymdefekt, sterben aber nach einiger Zeit ab, da sie *in vitro* nicht proliferieren können. Die einzigen in HAT-Medium lebensfähigen Zellen sind die durch die Fusion entstandenen Hybridome.

4.16.2.1 Material

RPMI 1640¹⁹

PBS siehe Abschnitt 4.2.1, S.19

Polyethylenglykol 1500 (PEG)¹⁶

HAT-Medium siehe Abschnitt 4.3.1, S.22

4.16.2.2 Durchführung

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet, die Bauchhöhle eröffnet und die Milz steril entnommen. Diese wurde mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb mit der Maschenweite 0,75 mm x 0,75 mm gedrückt und die Zellsuspension bei RT mit 225 x g 10 min. zentrifugiert. SP2/0 Zellen aus sechs 175 cm² Zellkulturflaschen wurden ebenso zentrifugiert, beide Zellpellets jeweils in 10 ml RT warmen RPMI 1640 resuspendiert und gezählt. Milzzellen und SP2/0 Zellen wurden im Verhältnis 1:3 zusammen in einem Röhrchen wie oben zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet vorsichtig in der verbleibenden Flüssigkeit gelöst. Unter Schwenken wurde 1,5 ml 37°C warmes PEG innerhalb einer Minute hinzugefügt und diese Zellsuspension 1 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 37°C warmen RPMI 1640 nach folgendem Schema: 1 ml innerhalb 30 sec., 3 ml in 30 sec. und 16 ml in 60 sec. Die Zellsuspension wurde bei RT mit 225 x g 5 min. zentrifugiert, anschließend 5 min. bei 37°C ins Wasserbad gestellt und dann erst der Überstand komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde in 50 ml 37°C warmen HAT-Medium resuspendiert, gezählt, auf 1,25 x 10⁶ Zellen/ml HAT-Medium verdünnt und auf 20 sterile 96-Flachlochplatten verteilt. Die ersten Hybridome waren nach ca. 1 Woche zu erkennen.

4.16.3 Selektion auf spezifische Hybridome (sog. Screening)

Die in den Hybridom-Überständen enthaltenen spezifischen Antikörper wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie getestet (vgl. Abschnitt 4.15, S.43). Dazu wurden zum einen eine stabil transfizierte Zelllinie, zum anderen PBL, die aus Hühnerblut gewonnen wurden, verwendet. Die positiv getesteten Klone wurden mit HT-Medium (siehe Abschnitt 4.3.1, S.22) in eine

24-Lochplatte überführt, wiederum getestet, zum Teil eingefroren und nach ca. 2 Wochen in Standardmedium kultiviert. Der Mediumüberstand der positiven Klone wurde abgenommen und zur längeren Lagerung bei 4°C mit 0,1 % Natriumazid versetzt.

4.16.4 Isotypenbestimmung

Bei der Maus gibt es vier verschiedene IgG-Isotypen: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃.

Die spezifischen mAk wurden durch Immunphänotypisierung von stabil transfizierten Zellen auf ihre Immunglobulin-Subklasse hin untersucht. Dabei wurden vier verschiedene Kavitäten mit dem gleichen primären Antikörper gefärbt und als sekundäre Antikörper die verschiedenen Isotyp-spezifischen FITC-markierten Konjugate (siehe Abschnitt 4.15.1, S.43) verwendet. Nur bei dem richtigen Isotyp-spezifischen sekundären Antikörper konnte die Bindung des primären mAk detektiert werden.

4.16.5 Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von IgG

Diese Methode wurde zum einen verwendet, um mAk aus Hybridomüberstand zu konzentrieren, und zum anderen, um das von 293T-Zellen produzierte huIg-Konstrukt (vgl. Abschnitt 4.12, S.34) aufzureinigen.

Die Reinigung beruht auf einer spezifischen Bindung des Streptokokken-Protein G an die F_c-Region von IgG Molekülen bei neutralem pH Wert [64]. Diese Bindung kann durch Veränderung des pH ins saure oder basische Milieu wieder gelöst werden.

Die Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe des GradiFrac™ Systems¹ durchgeführt.

4.16.5.1 Material

Protein G Sepharose 4 Fast Flow¹

Dialysierschlauch, VISKING, 14kDa cut off,¹⁹

Startpuffer

1,424 g Di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat (Na₂HPO₄·2H₂O)² in 400 ml Aqua dest.

0,936 g Natrium-di-hydrogenphosphat-mono-hydrat (NaH₂PO₄ · 1H₂O)² in 300 ml Aqua dest.

soviel NaH₂PO₄-Lösung in die Na₂HPO₄-Lösung geben, bis pH 7,0 erreicht, bei 4°C lagern.

Elutionspuffer

3,75 g Glycin²

ad 500 ml Aqua dest., pH 2,5 einstellen, bei 4°C lagern.

Trislösung 1 M

1,211 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan¹⁰

ad 10 ml Aqua dest., bei RT lagern.

Guanidinhydrochlorid 6 M

57,32 g Guanidinhydrochlorid²

ad 100 ml Aqua dest., bei RT lagern.

Dialysepuffer pH 7,8

45,0 g Natriumchlorid (NaCl)²

29,03 g Di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat (Na₂HPO₄·2H₂O)²

1,65 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)²

ad 5 l Aqua dest., vor Gebrauch ansetzen.

4.16.5.2 Durchführung

Die Durchlaufgeschwindigkeit der Säule wurde durch die peristaltische Pumpe auf 1 ml/min festgelegt. Die Protein G Sepharose Säule wurde zwischen Pumpe und Monitor UV-1 Einheit angeschlossen und mit mindestens 30 ml Startpuffer äquilibriert. Der Zellkulturüberstand wurde 10 min mit 716 x g zentrifugiert, 1:2 mit Startpuffer verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Es wurde solange Startpuffer über die Säule gegeben, bis die Extinktion bei 280 nm zur Basislinie zurückgekehrt war. Um die IgG Moleküle von der Säule zu waschen, wurde zu Elutionspuffer gewechselt. Das Eluat wurde in einem Röhrchen aufgefangen, sofort mit 1 M Trislösung auf pH 7 eingestellt und in einen Dialyseschlauch überführt. Das aufgereinigte Protein wurde dreimal mit 5 l Dialysepuffer umgepuffert und die Konzentration des aufgereinigten Antikörpers photometrisch bestimmt. Die hier verwendete Protein G Sepharose Säule bindet ca. 30 mg Mäuse IgG, abhängig vom Isotyp.

Um die Säule zu regenerieren, wurde sie nach der Elution erst mit 30 ml Startpuffer gespült, dann mit 20 ml 6 M Guanidinhydrochlorid, wieder mit 30 ml Startpuffer und zur Aufbewahrung bei 4°C zuletzt mit 20 % Ethanol.

4.17 ELISA

Der indirekte Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (*ELISA*) wurde verwendet, um die durch 293T-Zellen produzierten huIg-Konstrukte (vgl. Abschnitt 4.12, S.34) mit Hilfe des spezifischen mAk (vgl. Abschnitt 4.16, S.45) auf ihre Konformation hin zu überprüfen. Dabei wurde das Antigen (huIg-Konstrukt) auf eine Platte gebunden und daran der spezifische mAk, der mit einem sekundären, an Peroxidase gekoppelten Anti-Maus Antikörper detektiert wurde. Nach Zugabe eines Substrats konnte diese Bindung anhand eines durch das Enzym vermittelten Farbumschlags im Photometer gemessen werden.

4.17.1 Material

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3)¹⁰

6,00 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)¹⁰

ad 1000 ml Aqua bidest., bei 4°C lagern.

PBS-T (0,05 % Tween20)

0,5 ml Tween20®²

ad 1000 ml PBS (siehe Abschnitt 4.2.1, S.19), bei RT lagern.

5 % Magermilchpulverlösung

5 g Blotting Grade Blocker non-fat dry milk⁵

ad 100 ml PBS-T, vor Gebrauch herstellen.

TMB Puffer

8,2 g Na-Azetat (CH_3COONa)¹⁰

3,15 g Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$)¹⁰

ad 1000 ml Aqua bidest., bei 4°C lagern.

TMB Stammlösung

6 mg 3,3';5,5' Tetramethylbenzidin (*TMB*)¹⁹

ad 1 ml DMSO², lichtgeschützt bei RT lagern.

TMB-Gebrauchslösung

332	µl	TMB Stammlösung
10	ml	TMB Puffer, 37°C
3,3	µl	30 % H ₂ O ₂ ²

in der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort verwenden.

1 M Schwefelsäure

472	ml	Aqua dest.
28	ml	H ₂ SO ₄ 96 % ²

bei RT aufbewahren.

Anti-mouse-IgG-Peroxidase ¹⁹**4.17.2 Durchführung**

Eine NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatte wurde mit dem aufgereinigten huIg-Konstrukt (vgl. Abschnitt 4.16.5, S.47) in einer Konzentration von 3 µg/ml Beschichtungspuffer mit 100 µl/Kavität beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde mit Hilfe eines ELISA-Washers mit PBS-T gewaschen und 60 min. bei 37°C mit 5 % Magermilchpulverlösung blockiert, um unspezifische Bindungen an die Platte zu verhindern. Anschließend wurde die Platte wieder gewaschen und 90 min. bei 37°C mit aufgereinigten spezifischen mAk in einer Konzentration von 10 bzw. 2 µg/ml PBS-T mit 100 µl/Kavität inkubiert. Dabei wurde der Antikörper in einer log₂ Verdünnung als Doppelansatz aufgetragen; als Kontrollantikörper diente der aufgereinigte CT3 (siehe Abschnitt 4.15.1, S.43). Nach dem Waschen der Platte wurde der sekundäre Antikörper Anti-mouse-IgG-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:20000 in PBS-T mit 100 µl/Kavität für 90 min. bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde wiederum gewaschen und mit 100 µl/Kavität TMB-Gebrauchslösung ca. 10 min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Der dabei entstandene Farbumschlag wurde durch Zugabe von 50 µl/Kavität 1 M Schwefelsäure abgestoppt und im Plattenphotometer bei 450 nm gemessen.

4.18 Oberflächenbiotinilierung von Zellen

Durch diese Methode [65] wurden alle Proteine auf der Zelloberfläche mit Biotin markiert. Das Zelllysat (siehe Abschnitt 4.19, S.52) wurde anschließend mit einem, für ein bestimmtes

Oberflächenprotein spezifischen mAk, immunpräzipitiert (siehe Abschnitt 4.20, S.53). Dieses, ebenfalls biotinierte Protein konnte durch eine an Streptavidin gekoppelte Peroxidase im Western Blot nachgewiesen werden

4.18.1 Material

Kalziumchlorid 1 M

14,7 g Kalziumchloriddihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)²
ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

Magnesiumchlorid 1 M

20,33 g Magnesiumchlorid x 6 H₂O ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)²
ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

PBS (plus Ca^{2+} und Mg^{2+})

500 ml PBS, siehe Abschnitt 4.2.1, S.19
500 µl Magnesiumchlorid 1 M
50 µl Kalziumchlorid 1 M

bei 4°C aufbewahren.

Sulfo-NHS-Biotin Stammlösung (200 mg/ml)

50 mg Sulfo-NHS-Biotin¹⁴
250 µl DMSO²

durch 5-minütiges schütteln auflösen, in Aliquots von 15 µl bei -20°C lagern.

Sulfo-NHS-Biotin Gebrauchslösung (0,5 mg/ml)

6 ml PBS (plus Ca^{2+} und Mg^{2+})
15 µl Sulfo-NHS-Biotin Stammlösung

kurz vor Gebrauch herstellen.

RPMI 1640³

4.18.2 Durchführung

Bei der Biotinilierung von Suspensionszellen wurden 1×10^7 Zellen, bei der Verwendung von primären Zellen 5×10^7 Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C mit $225 \times g$ gewonnen. Das Zellpellet wurde zweimal durch Zentrifugation mit eiskaltem PBS (plus Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und in 6 ml Sulfo-NHS-Biotin Gebrauchslösung (0,5 mg/ml) resuspendiert. Nach 40 min. Rotation bei 4°C wurde wie oben zentrifugiert und das Pellet in 10 ml RPMI 1640 resuspendiert, um nicht gebundenes Sulfo-NHS-Biotin aus der Reaktion zu entfernen. Es wurde noch zweimal mit eiskaltem PBS (plus Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und die Zellen anschließend, wie nachfolgend beschrieben, lysiert.

Zur Kontrolle wurden die Zellen vor und nach der Biotinilierung mit SA-FITC gefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abschnitt 4.15, S.43).

4.19 Zellyse

Um die Gesamtproteinfraktion einer Zelle zu erhalten, wurden die Zellen mit einem Detergenz (Triton-X-100) lysiert, zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand weiterverwendet.

4.19.1 Material

5 M NaCl-Lösung

29,22 g Natriumchlorid (NaCl)²

ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

0,5 M Trislösung pH 7,4

6,05 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan¹⁰

ad 60 ml Aqua bidest., pH 7,4 mit HCl einstellen, auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen, bei RT lagern.

2 x Lysestammlösung

10 ml 0,5 M Trislösung pH 7,4

3 ml 5 M NaCl-Lösung

1 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) (siehe Abschnitt 4.8.1, S.31)

1 ml 10 % Natriumazid (siehe Abschnitt 4.15.1, S.43)

ad 50 ml Aqua bidest., bei 4°C aufbewahren.

10 % Triton-X-100

5 g Triton-X-100¹⁹

ad 50 ml Aqua bidest., bei 4°C lagern.

25 x Complete (Proteaseinhibitor)

1 Tablette Complete¹⁶

ad 2 ml Aqua bidest, in Aliquots von 40 µl bei -20°C lagern.

Lysepuffer

500 µl 2x Lysestammlösung

100 µl 10 %Triton

40 µl 25x Complete

360 µl Aqua bidest.

vor Gebrauch herstellen.

4.19.2 Durchführung

5×10^7 bis 1×10^8 Zellen wurden 10 min. bei 4°C mit 225 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 45 min. Inkubation auf Eis und 30 min. Zentrifugation mit 16000 x g bei 4°C wurde der Überstand in ein Röhrchen überführt und das Zelllysate bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

4.20 Immunpräzipitation

Diese Methode wurde verwendet, um ein bestimmtes Protein aus dem Zelllysate aufzureinigen. Das Gesamtlysate wurde dabei mit Protein-G-Agarosekügelchen, die den für dieses Protein spezifischen Antikörper gebunden haben, für mehrere Stunden inkubiert und dieses Protein dann ausgewaschen.

4.20.1 Material

Anti-FLAG M2® Agarose Affinity Gel¹⁹

Agarose-mAk-Gemisch

500	µl	PBS (siehe Abschnitt 4.2.1, S.19)
50	µl	Protein G Agarose ¹⁶
1,5	µg	aufgereinigter mAk (siehe Abschnitt 4.16.5, S.47)

kurz vor Gebrauch ansetzen.

Waschpuffer

500	µl	2x Lysepuffer (siehe Abschnitt 4.19.1, S.52)
100	µl	10 % Triton-X-100 (siehe Abschnitt 4.19.1, S.52)
400	µl	Aqua bidest.

kurz vor Gebrauch ansetzen.

6 x Probenpuffer

7	ml	4x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8
3	ml	Glycerol ²
1	g	SDS ⁵
1,2	mg	Bromphenolblau ¹⁹

ad 10 ml Aqua bidest., in 1 ml Aliquots bei -20°C lagern.

1x SDS Probenpuffer

100	µl	6 x Probenpuffer
500	µl	Aqua bidest.

bei -20°C aufbewahren.

4.20.2 Durchführung

Bei Verwendung des Agarose-mAk-Gemisches wurde dieses 1 Stunde bei 4°C in einem 1,5 ml Röhrchen rotiert und anschließend mit 1 ml Waschpuffer, durch kurzzeitige Zentrifugation bis 16000 x g und vorsichtiges Absaugen des Überstands durch eine Wasserstrahlpumpe, gewaschen. 1 ml Zelllysat (siehe Abschnitt 4.18.1, S.51) wurde dazupipettiert und mit Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert.

Wurden Anti-FLAG M2 Agarosekügelchen verwendet (z. B. bei Immunpräzipitation von FLAG-Konstrukten), wurden 50 µl davon direkt zu 1 ml Zelllysat gegeben und wie oben inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen der Agarosekügelchen wurden diese zusammen mit 100 μ l 1 x SDS Probenpuffer 5 min. lang bei 100°C gekocht, um die Bindung zwischen Protein, Antikörper und Agarose zu zerstören. Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert und das nun im Überstand enthaltene Protein in ein neues Röhrchen überführt und bei -20°C aufbewahrt.

4.21 Deglykosilierung von Proteinen

Durch das Enzym N-Glycosidase F (PNGaseF) werden die an die AS Asparagin N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste entfernt.

4.21.1 Material

PNGase F ¹²

10 x G7 Puffer ¹²

10 % NP-40 ¹²

1 x Denaturierungspuffer

10	μ l	10 x Denaturierungspuffer ¹²
90	μ l	Aqua bidest.

vor Gebrauch ansetzen.

3 x SDS Probenpuffer

100	μ l	6 x SDS Probenpuffer, siehe Abschnitt 4.20.1, S.53
100	μ l	Aqua bidest.

bei -20°C aufbewahren.

4.21.2 Durchführung

Das zu deglykosilierende Protein wurde durch Immunpräzipitation (vgl. Abschnitt 4.20, S.53) aufgereinigt und statt in 100 μ l 1 x SDS Probenpuffer in 100 μ l 1 x Denaturierungspuffer aufgenommen. 10 μ l davon wurden mit 1,6 μ l G7 Puffer, 1,6 μ l 10 % NP-40 und 2,8 μ l PNGase F vermischt. Außerdem wurde ein Kontrollansatz ohne das Enzym hergestellt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde 8 μ l 3 x SDS Probenpuffer dazugegeben, dies 5 min. bei 95°C gekocht und in einem Western Blot analysiert.

4.22 Western Blot

Der Western Blot diente zum Nachweis eines Proteins und zur Bestimmung seines relativen Molekulargewichts durch einen spezifischen, an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch einen Vergleich mit einem ebenso im SDS-PAGE aufgetrennten biotinilierten Marker, der durch an Streptavidin gekoppelte Peroxidase nachgewiesen wurde.

4.22.1 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*SDS-PAGE*) [66] binden Proteine das negativ geladene, denaturierende Detergenz SDS in einem Verhältnis von 1,4 g/g Protein. Die eigentliche Ladung des Proteins wird dadurch maskiert und die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt ladungsunabhängig nur nach seinem Molekulargewicht. Unter reduzierenden Bedingungen, d. h. Zugabe von 5 % β -Mercaptoethanol, werden die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zwischen Cysteinen aufgelöst. Durch einen Vergleich mit dem nicht-reduzierten Protein können Rückschlüsse auf die Quartärstruktur gezogen werden.

4.22.1.1 Material

4 x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8

91	g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan ¹⁰
2	g	SDS ⁵

ad 500 ml H₂O, mit HCl auf pH 8,8 einstellen, bei 4°C aufbewahren.

4 x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8

6,05	g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan ¹⁰
0,4	g	SDS ⁵

ad 100 ml H₂O, mit HCl auf pH 6,8 einstellen, bei 4°C aufbewahren.

10 % APS

0,1	g	Ammoniumpersulfat (APS) ⁵
-----	---	--------------------------------------

ad 1 ml Aqua bidest, bei -20°C lagern.

10 % Trenngel

4,2	ml	Aqua bidest.
2,5	ml	4 x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8
3,3	ml	30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid-Lösung ⁵
50	µl	10 % APS
15	µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (<i>TEMED</i>) ²

in der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort gießen.

Sammelgel

3,085	ml	Aqua bidest.
1,25	ml	4 x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8
0,665	ml	30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid-Lösung ⁵
25	µl	10 % APS
7,5	µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (<i>TEMED</i>) ²

in der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort gießen.

5 x Elektrophoresepuffer

15,1	g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan ¹⁰
72,0	g	Glycin ²
5,0	g	SDS ⁵

ad 1000 ml Aqua dest., bei 4°C aufbewahren, zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen.

Isobutanol ¹⁰**β-Mercaptoethanol ⁵****Prestained Protein Ladder, ~10-180kDa ⁹****ECL Protein M.W. Marker ¹****4.22.1.2 Durchführung**

Das 10 %ige Trenngel wurde in eine BioRad mini Protean II Gießkammer eingefüllt und mit 500 µl Isobutanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min bei RT wurde das Isobutanol durch Auswaschen mit Aqua dest. entfernt, das 4 %ige Sammelgel eingefüllt und ein 10er Probentaschenkamm eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1 x Elektrophoresepuffer überschichtet. Es wurden 10 µl der immunpräzipitierten Proben wahlweise mit 0,5 µl β-Mercaptoethanol

versetzt, 5 min. bei 95°C gekocht und die Proben in die Geltaschen eingefüllt. Als Marker wurden die Prestained Protein Ladder und der biotinierte ECL Protein M.W. Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Anschließend wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proben durch Blotten auf Nitrozellulose überführt.

4.22.2 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (Semi-Dry-Elektroblotting)

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose erfolgte im Semi-dry-Elektroblotter [67].

4.22.2.1 Material

Anodenpuffer I, 300 mM, pH 10,4

36,33 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan¹⁰
200 ml Methanol¹⁰

ad 1000 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

Anodenpuffer II, 25 mM, pH 10,4

3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan¹⁰
200 ml Methanol¹⁰

ad 1000 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

Kathodenpuffer, pH 9,4

3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan¹⁰
200 ml Methanol¹⁰
5,25 g ε-Aminocaprinsäure¹⁹

ad 1000 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

5 % Magermilchpulverlösung siehe Abschnitt 4.17.1, S.49

Nitrozellulosemembran BA83 Porengröße 0,2 µm¹⁸

Filterpapier Nr. 3²⁴

4.22.2.2 Durchführung

Der Blot zwischen den Plattenelektroden wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf die mit Aqua bidest. benetzte Platte wurden 4 Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier gelegt, es folgten 2 Lagen in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier, die durch Aqua bidest. befeuchtete Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und 4 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier; alles auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die obere Elektrodenplatte wurde aufgesetzt und 90 min. lang eine konstante Stromstärke von 0,8 mA/cm² Nitrozellulose (45 mA/Gel) angelegt. Nach Beendigung des Blottens wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C in 5 % Magermilchpulverlösung blockiert.

4.22.3 Proteindetektion durch spezifische Antikörper

Die an die Nitrozellulosemembran gebundenen, aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*POD* oder *HRP*) markiert waren, detektiert. Nach Zugabe eines Chemolumineszenz-Substrats katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol. Das dabei entstehende angeregte Dioxetan zerfällt unter Lichtabgabe, was auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann.

4.22.3.1 Material

PBS-T siehe Abschnitt 4.17.1, S.49

Antikörper:

Anti-FLAG M2® Monoclonal Antibody-POD Conjugate¹⁹ 1:20000 in PBS-T verdünnen

RC20H, Anti-PTyr HRPO²², 1:5000 in PBS-T verdünnen

Anti-SHPTP-1/SHP1²³ (Rabbit-Anti-SHP-1), 1 µg/ml in PBS-T verdünnen

SH-PTP2 (C-18)²¹ (Rabbit-Anti-SHP-2), 1 µg/ml in PBS-T verdünnen

Anti-Rabbit-Ig-HRP¹ 1:5000 in PBS-T verdünnen

SA-HRP¹⁷ 1:20000 in PBS-T verdünnen

Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate¹⁴

Kodak BioMax MR (Röntgenfilm)¹

4.22.3.2 Durchführung

Die in 5 % Magermilchpulverlösung blockierte Nitrozellulose wurde 15 min. mit PBS-T gewaschen und anschließend 2 Std. mit dem primären Antikörper in der oben angegebenen Verdünnung inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch Waschen mit PBS-T (1 x 15 min. und 5 x 5 min.) entfernt. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (Anti-rabbit-HRP) für 1 Std. inkubiert und wie oben gewaschen. Ein sekundärer Antikörper war bei an HRP-direkt-gekoppelten primären Antikörpern nicht notwendig. Zuletzt wurde die Membran 5 min. mit Chemolumineszenz-Substrat inkubiert und entwickelt.

4.23 Pervanadatbehandlung von stabil transfizierten 2D8-Zellen

Pervanadat hemmt die Tyrosin-Phosphatasen in Zellen. Dadurch kommt es zur erhöhten Phosphorylierung von Tyrosinresten, z. B. in ITIMs. Phosphorylierte Tyrosinreste können durch Anti-Phosphotyrosin-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. Außerdem ist es möglich, weitere Moleküle der Signaltransduktionskaskade, die nach Phosphorylierung der Tyrosinreste rekrutiert werden, durch entsprechende Antikörper nachzuweisen [15].

4.23.1 Material

Standardmedium siehe Abschnitt 4.3.1, S.22

Orthovanadat 0,1 M

0,184 g Orthovanadat¹⁹

ad 10 ml Aqua bidest., vor Gebrauch herstellen.

Natriumfluorid 0,5 M

2,1 g Natriumfluorid (NaF)¹⁰

ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

Aktivierte Stammlösung

100 µl Orthovanadat 0,1 M

900 µl Wasser¹⁹

1,7 µl 30 % H₂O₂²

nach Herstellung 15 min bei RT aktivieren, sofort verwenden.

PBS mit Phosphataseinhibitoren

50	ml	PBS, siehe Abschnitt 4.2.1, S.19
40	µl	EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0), siehe Abschnitt 4.8.1, S.31
200	µl	Orthovanadat 0,1 M

vor Gebrauch herstellen.

Lysepuffer

1000	µl	2 x Lysestammlösung, siehe Abschnitt 4.19.1, S.52
200	µl	10 % Triton, siehe Abschnitt 4.19.1, S.52
80	µl	25 x Complete, siehe Abschnitt 4.19.1, S.52
40	µl	Natriumfluorid 0,5 M
8	µl	EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0), siehe Abschnitt 4.8.1, S.31
20	µl	Orthovanadat 0,1 M
652	µl	Aqua bidest.

vor Gebrauch herstellen.

4.23.2 Durchführung

Stabil transfizierte 2D8-Zellen (siehe Abschnitt 4.13.2, S.37) wurden mit 37°C warmen Standardmedium auf eine Zelldichte von 1×10^7 /ml eingestellt und 15 ml davon gleichmäßig auf 3 Röhrchen verteilt. Pro Ansatz wurden 50 µl aktivierte Stammlösung dazupipettiert und dieser 0,5 bzw. 15 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde sofort danach durch Zugabe von PBS mit Phosphataseinhibitoren gestoppt, die Zellen 10 min. bei 4°C mit 225 x g zentrifugiert und jeder Ansatz in 600 µl Lysepuffer, wie in Abschnitt 4.19, S.52 beschrieben, lysiert. Nach Immunpräzipitation wurden die Zellproteine im Western Blot analysiert.

4.24 Proliferationsassay

Dieser Test wurde eingesetzt, um durch Kreuzvernetzung von CHIR-B2 seine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von 2D8-Zellen nachzuweisen [68]. Dabei wurde stabil transfizierten 2D8-Zellen für eine begrenzte Zeit radioaktiv markiertes Thymidin im Überschuss angeboten, das während der DNA-Replikation bei der Zellteilung eingebaut wurde. Die Zellen wurden auf einen Filter übertragen und mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Diese enthält Moleküle, deren Elektronen durch die niedrigerenergetische Beta-

Strahlung des Tritiums [^3H] in der Atomhülle angeregt werden auf eine äußere Schale zu springen. Beim Zurückfallen in ihren ursprünglichen Zustand wird die freiwerdende Energie in Licht umgewandelt, das mit einem Detektor gemessen wird.

4.24.1 Material

PBS siehe Abschnitt 4.2.1, S.19

Standardmedium siehe Abschnitt 4.3.1, S.22

^3H -Thymidin-Gebrauchslösung

0,5 ml ^3H Thymidin (5 mCi/5 ml)¹

ad 10 ml RPMI 1640³, bei 4°C aufbewahren.

Glass-fiber Filter¹³

Szintillationsflüssigkeit¹³

4.24.2 Durchführung

Eine sterile 96-Lochplatte wurde mit dem aufgereinigten spezifischen Antikörper gegen CHIR-B2 (3H7) in einer Konzentration von 10 µg/ml PBS mit 50 µl/Kavität 2 Std. bei 37°C inkubiert. Als Kontrollantikörper wurde die Platte mit dem aufgereinigten CT3 (siehe Abschnitt 4.15.1 S.43) in gleicher Konzentration beschichtet. Die Platte wurde dreimal mit PBS gewaschen und stabil transfizierte 2D8-Zellen (siehe Abschnitt 4.13.2, S.37) in einer Zelldichte von 5×10^4 /ml Standardmedium eingesät. Nach 18 Std. bei 41°C wurde 20 µl ^3H -Thymidin-Gebrauchslösung (1 µCi) in jede Kavität pipettiert und für weitere 6 Std. inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Harvester auf Glass-fiber Filter übertragen. Nach Trocknen und Einlegen des Filters in eine 96-Lochplattenhalterung wurde dieser mit 20 µl Szintillationsflüssigkeit pro Delle benetzt, mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt und im Beta-Counter gemessen. Das Maß der Proliferation wurde in counts per minute (*cpm*) angegeben.

4.25 Computerprogramme zur Auswertung von Sequenzen

4.25.1 DNASTAR Lasergene Software

Die Programme Seqman™, MapDraw™, EditSeq™ und MegAlign™ wurden zur Analyse von DNA- und AS-Sequenzen verwendet.

4.25.2 PSORT II

Im Internet frei verfügbar unter www.expasy.ch, Link: Proteomics. PSORT II wurde zur Bestimmung von Signalpeptiden und transmembranen Bereichen genutzt.

4.25.3 Blastx

Das Programm ist unter www.ncbi.nlm.nih.gov/blast, Link: translated query vs. protein database, frei verfügbar. Es wurde verwendet, um DNA-Sequenzen mit in dieser Datenbank vorhandenen Proteinen aller möglichen Spezies zu vergleichen. Dabei wurden die Proteine in der Reihenfolge ihrer Ähnlichkeit zur DNA-Sequenz sortiert.

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung von sieben verschiedenen CHIR

5.1.1 EST-Datenbankanalyse

Zur Identifizierung neuer Sequenzen, die für CHIR kodieren, wurden EST-Datenbanken des Huhns verwendet. Es handelt sich dabei um Sammlungen von cDNA Sequenzen einer bestimmten Zellart oder eines Gewebes. Dazu wird die mRNA, z. B. von Bursazellen, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, diese in Vektoren kloniert und ansequenziert. Diese Sequenzen werden in Datenbanken gesammelt und über das Internet zur Verfügung gestellt.

Bei den hier verwendeten Datenbanken handelt es sich um www.chickest.udel.edu, mit über 40000 Sequenzen aus unterschiedlichsten Gewebearten und <http://swallow.gsf.de/DT40/dt40Est.html>, aus Bursa B-Zellen. In beiden wurde eine Stichwortsuche mit dem Begriff „Immunoglobulin-like“ durchgeführt und die dadurch erhaltenen 38 verschiedenen Sequenzen mit Hilfe des Programms „Seqman™“ analysiert. Dieses Programm fasst Sequenzen mit hoher Homologie nach festgelegten Parametern zu einer Gruppe (sog. Contig) zusammen. Die Basenpaarsequenzen von 7 verschiedenen Contigs wurden mit Hilfe des Programms „MapDraw™“ in die möglichen AS-Sequenzen umgewandelt. Diese wurden auf offene Leserahmen (*ORF*), Signalpeptide, Ig-Domänen, transmembrane Bereiche und ITIMs untersucht. Die verwendeten Contigs sind in Abb. 5-1 auf S.65 zusammengefasst. Es handelt sich dabei um Contig 5 und Contig 8, beide bestehend aus einem Signalpeptid, zwei Ig-Domänen, einem transmembranem Bereich und zwei ITIMs und Contig 7 mit nur einer Ig-Domäne und einem ITIM. Alle drei sind Typ I transmembrane Proteine, d. h. das N-terminale Ende befindet sich auf der extrazytoplasmatischen Seite.

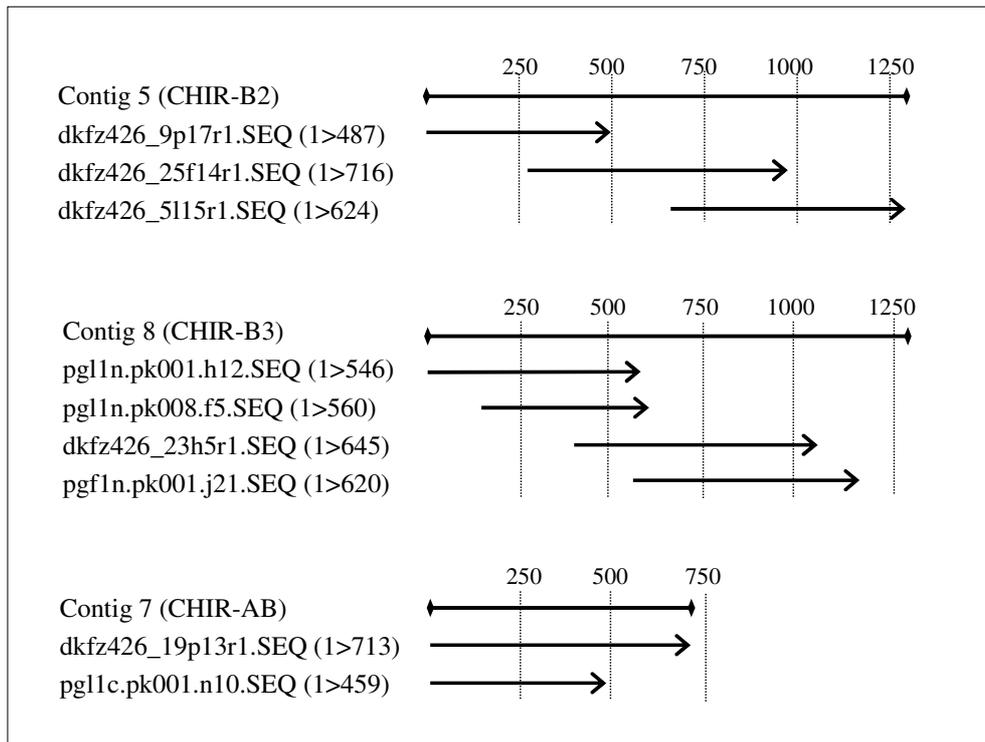


Abb. 5-1: Alle Sequenzen aus den EST-Datenbanken wurden mit dem Programm „Seqman™“ in Gruppen (sog. Contigs) zusammengefasst. Die Abbildung zeigt schematisch die verwendeten Contigs und die Orientierung der Ursprungssequenzen. Die Sequenzen mit dem Kürzel „dkfz_426“ stammen aus <http://swallow.gsf.de/DT40/dt40Est.html>, die anderen aus www.chickest.udel.edu.

5.1.2 Primersynthese, PCR und Sequenzanalyse von Contig 5, 7 und 8

Zur Amplifizierung der einzelnen CHIR wurden verschiedene Primer synthetisiert (vgl. dazu Tab. 4-2, S.29). Primer 474 wurde als sense Primer für alle PCRs eingesetzt, da alle hier identifizierten CHIR in ihrem Signalpeptid fast identisch sind. Für Contig 5, 7 und 8 wurde je ein spezifischer antisense Primer aufgrund der Datenbanksequenz synthetisiert. Der Primer 475 bindet an der C-terminalen ITIM-Sequenz von Contig 5, 476 an der ITIM-Sequenz von Contig 7, 485 am 3' Ende von Contig 7 und 498 am 3' Ende von Contig 8. Nachdem keine Information über das Expressionsmuster der verschiedenen CHIR vorlag, wurde mit diesen Primern auf unterschiedlichen cDNAs PCRs durchgeführt, die erhaltenen Banden kloniert und sequenziert.

5.1.3 Einführung einer neuen Nomenklatur

Durch die Identifizierung neuer CHIR musste die Nomenklatur dieser Rezeptorfamilie unter Einbeziehung der bereits publizierten CHIR erweitert werden. Alle inhibitorischen Rezeptoren wurden als CHIR-Bn fortlaufend durchnummeriert, alle aktivierenden als CHIR-An

und Rezeptoren, die potenziell beide Eigenschaften besaßen wurden CHIR-ABn benannt. Das bedeutet, der bereits publizierte CHIR-B ist nun CHIR-B1 und CHIR-A ist nun CHIR-A1. Eine Zusammenfassung aller CHIR befindet sich in Tab. 5-1, S.70. Eine schematische Darstellung aller Rezeptoren ist in Abb. 5-8, S.73 zu sehen.

5.1.4 Analyse der AS-Sequenz von Contig 5, 7 und 8

Aus der DNA-Sequenz wurde die AS-Sequenz abgeleitet und sog. DNA-Karten der einzelnen Rezeptoren erstellt.

Aufgrund seiner AS-Struktur wurde Contig 5 in CHIR-B2 (siehe Abb. 5-2, S.67) und Contig 8 in CHIR-B3 (ohne abgebildete DNA-Karte) umbenannt, da beide die Eigenschaften eines inhibitorischen Rezeptors besitzen. Sowohl CHIR-B2, als auch CHIR-B3 haben zwei ITIMs in ihrem zytoplasmatischen Bereich, die 24 AS voneinander entfernt sind.

Bei der Amplifizierung von Contig 7 mit den Primern 474/485 und 474/476 wurden zwei verschiedene DNA-Sequenzen isoliert. Da beide sowohl Sequenzmerkmale eines inhibitorischen Rezeptors (ein ITIM im zytoplasmatischen Bereich), als auch eines aktivierenden Rezeptors (eine positiv geladene AS im transmembranen Bereich) besaßen, wurden sie CHIR-AB1 (siehe Abb. 5-3, S.68) und CHIR-AB2 genannt. CHIR-AB1 besitzt die positiv geladene AS Arginin, CHIR-AB2 Lysin im transmembranen Bereich.

Auffällig ist eine ITIM ähnliche Sequenz (LTYAEM) 24 AS vor dem ITIM. Diese könnte durch Mutation eines ITIMs entstanden sein. Würde die letzte Base dieser Sequenz (Guanin) in Cytosin, Thymin oder Adenin verändert werden, wäre anstatt eines Methionin ein Isoleucin in der AS-Sequenz vorhanden und somit eine echtes ITIM vorhanden.

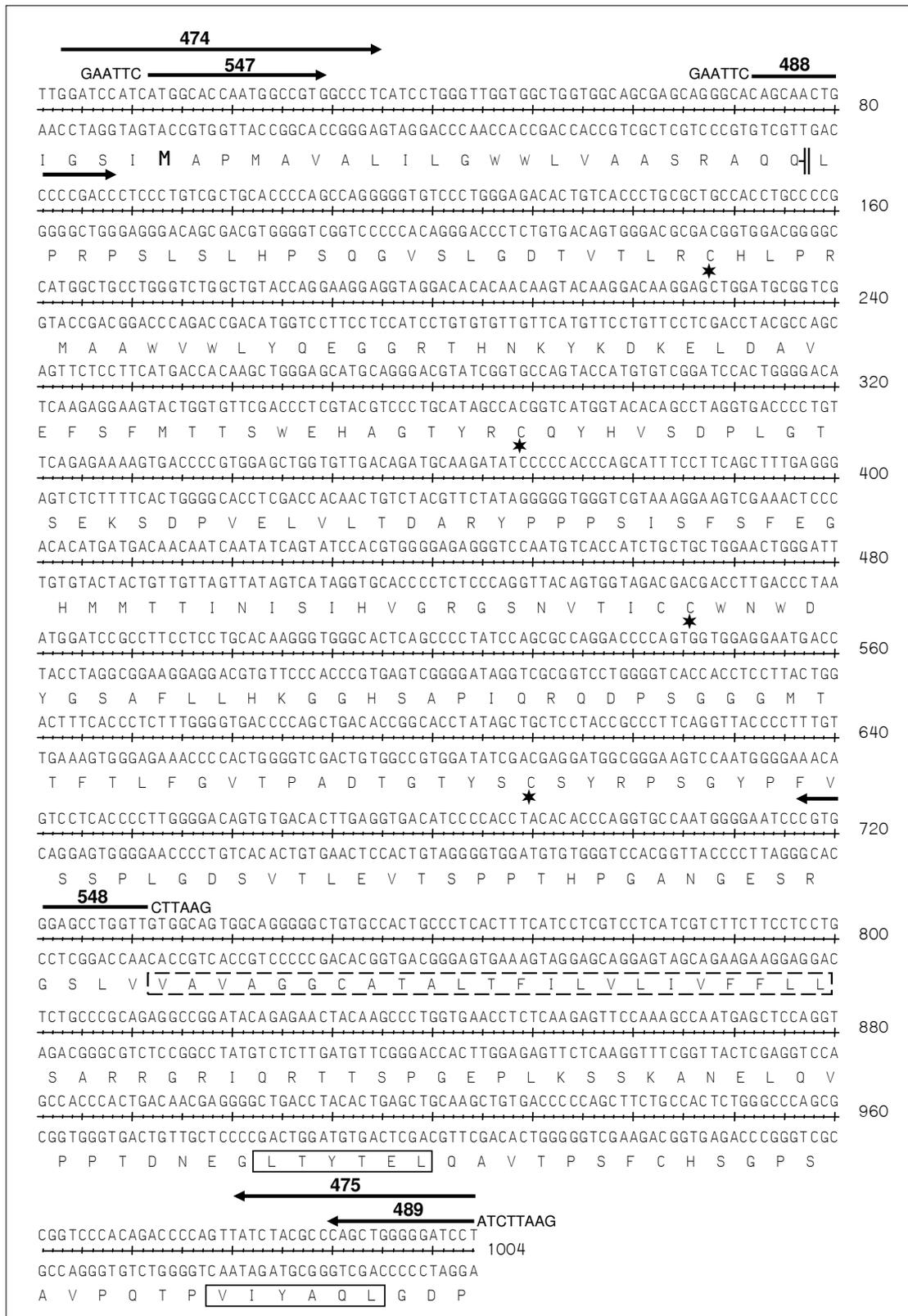


Abb. 5-2: DNA-Karte von CHIR-B2. Folgende Strukturmerkmale sind herausgehoben: Das Startcodon (AS Methionin), das Ende des Signalpeptids (||), die für die Bildung der Ig-Domänen verwendeten Cysteine (*), der transmembrane Bereich (◻) und die ITIMs(□). Außerdem sind alle sense (→) und antisense (←) Primer, die für die Identifizierung und für die weitere Charakterisierung verwendet wurden, vermerkt.

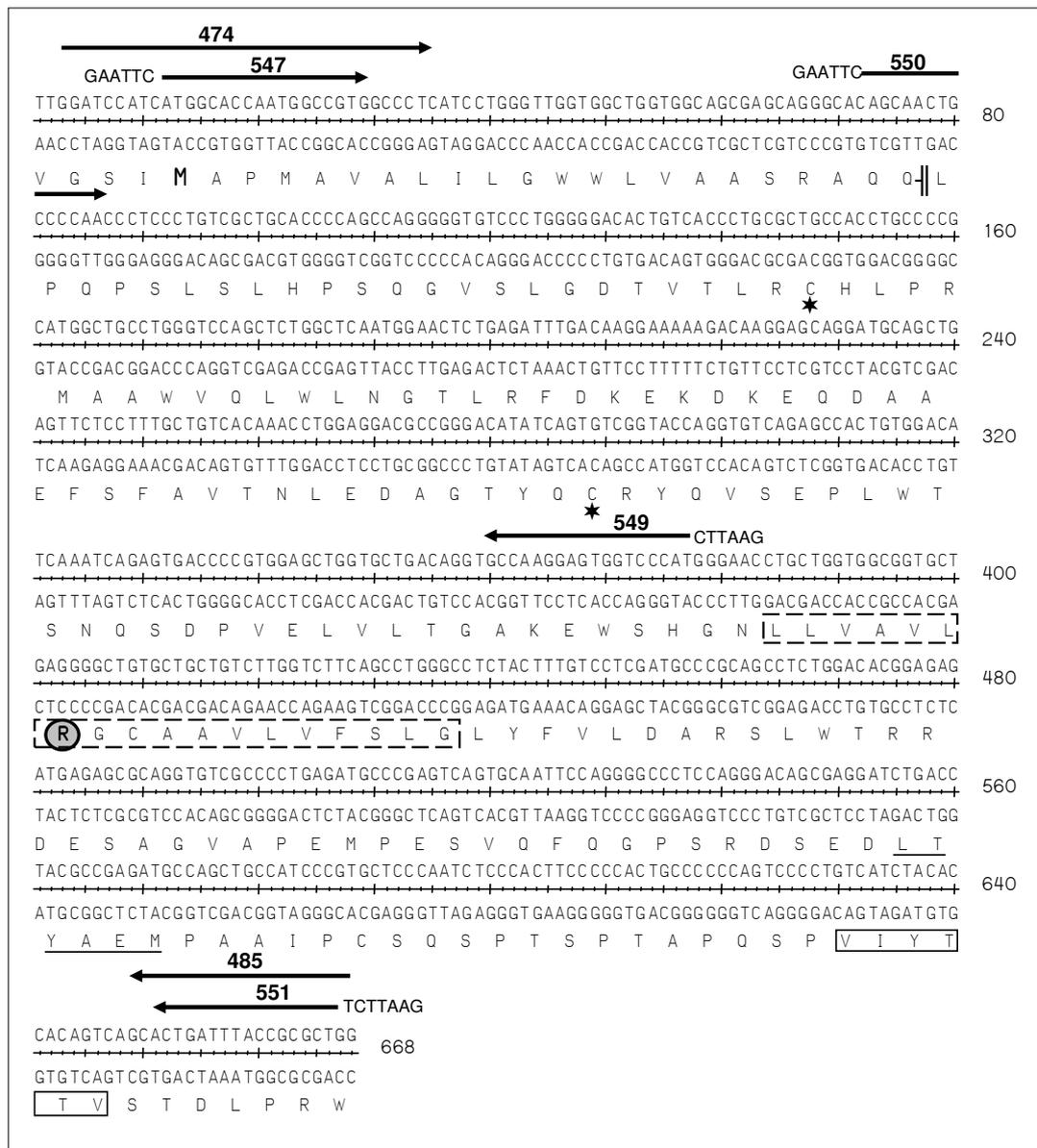


Abb. 5-3: DNA-Karte von CHIR-AB1. Die Beschriftung erfolgte wie in Abb. 5-2 beschrieben. Zusätzlich dazu wurde die positiv geladene AS Arginin (®) gekennzeichnet. Die eventuell durch Mutation entstandene ITIM-ähnliche Sequenz (LTYAEM) wurde unterstrichen dargestellt.

5.1.5 Identifizierung eines aktivierenden Rezeptors

Für die Klonierung eines aktivierenden Rezeptors (durch die EST-Datenbankanalyse wurde keine geeignete Sequenz gefunden) wurde aufgrund der bekannten Sequenz von CHIR-A [46] (Zugangsnummer: AF306851) ein antisense Primer (453) hergestellt. Nach PCR mit Primern 474/453 und anschließender Sequenzanalyse mehrerer Klone, ergaben sich zwei verschiedene DNA-Sequenzen. Die erste hatte die positiv geladene AS Arginin im transmembranen Bereich (die bereits publizierte CHIR-A Sequenz enthält die AS Histidin). Die zweite besaß in diesem Bereich keine positiv geladene AS. Mit Hilfe der RACE-PCR mit den Primern 501 bzw. 500 wurde das 3' Ende (mit Stopp Codon) identifiziert und aufgrund des Ergebnisses zwei weitere Primer synthetisiert (556 bzw. 574), um beide in voller Länge

herzustellen. Durch die PCR-Amplifizierung mit den Primern 474/556 wurde ein aktivierender Rezeptor mit der positiv geladenen AS Arginin im transmembranen Bereich und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil, nun CHIR-A2 genannt (siehe Abb. 5-4), identifiziert.

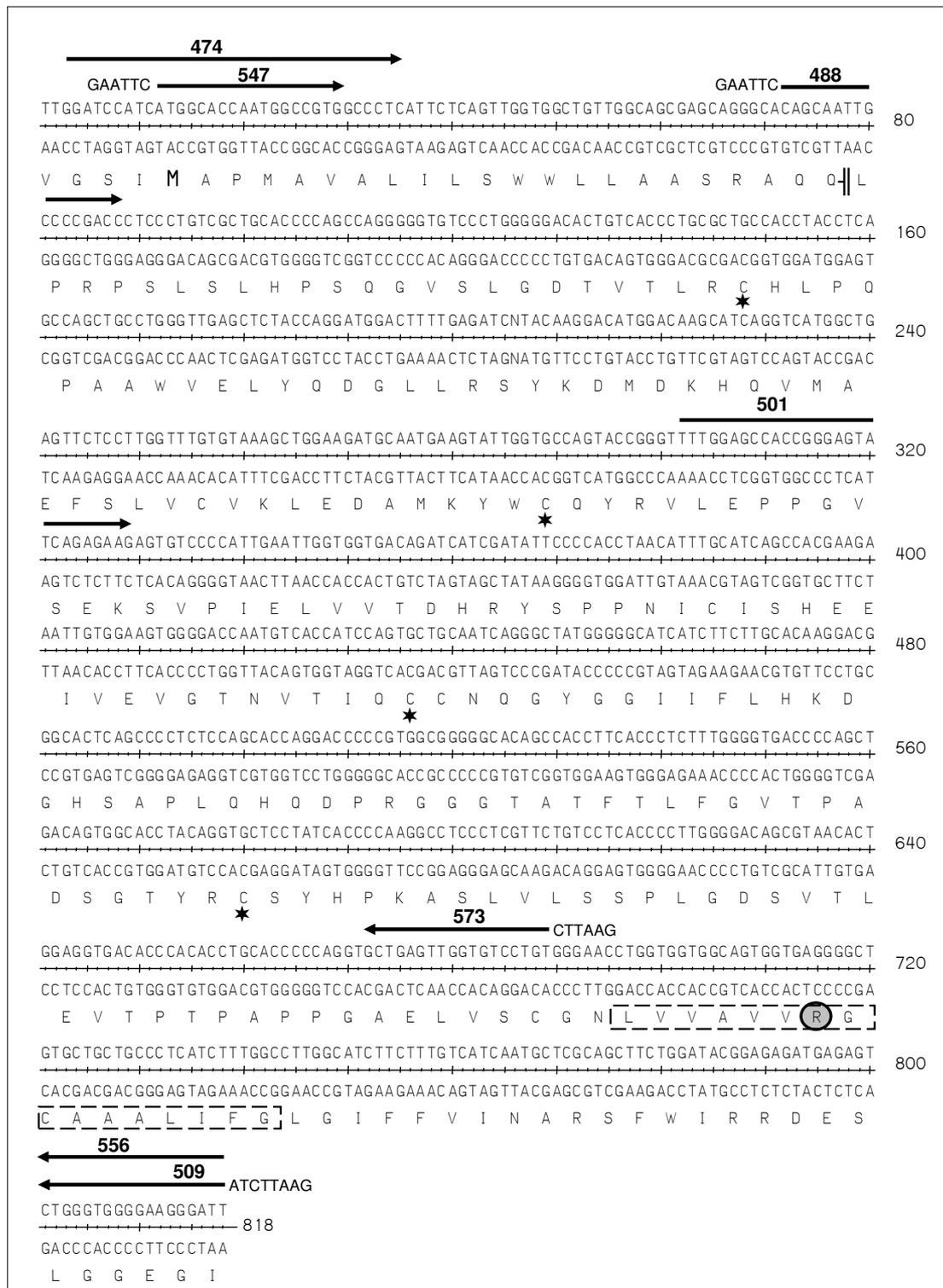


Abb. 5-4: DNA-Karte von CHIR-A2. Die Beschriftung erfolgte wie in Abb. 5-2 und 5-3 beschrieben.

Interessanterweise konnte durch PCR mit den Primern 474/574 ein inhibitorischer Rezeptor amplifiziert werden. Dieser besaß einen ungeladenen transmembranen Bereich und zwei ITIMs und wurde CHIR-B4 genannt (ohne Karte).

5.1.6 Zusammenfassung und vergleichende Analyse aller CHIR

Die nachfolgende Tabelle zeigt alle, in ihrer Sequenz unterschiedlichen CHIR, die mittels PCR identifiziert wurden und schließt auch die bereits publizierten Rezeptoren CHIR-A1 und CHIR-B1 ein.

Name	Primer (as)	cDNA	Hühnerlinie	Wirkungsweise
CHIR-B1	Referenz [46]	Milz	B2	Inhibitorisch
CHIR-B2	475	Bursa	B19	Inhibitorisch
CHIR-B3	498	IFN γ aktivierte Makrophagen	B19	Inhibitorisch
CHIR-B4	574	iIEL	B19	Inhibitorisch
CHIR-A1	Referenz [46]	Milz	B2	Aktivierend
CHIR-A2	556	PBL	M11	Aktivierend
CHIR-A3	556	iIEL	B19	Aktivierend
CHIR-AB1	485	Milz	B19	Potenziell inhibitorisch und aktivierend
CHIR-AB2	476	CD3 ⁺ CD8 ⁺ angereicherte NK-Zellen (von T. Göbel zur Verfügung gestellt)	B19	Potenziell inhibitorisch und aktivierend

Tab. 5-1: Die mittels PCR identifizierten CHIR mit Angabe des Ursprungsgewebes und der potenziellen Wirkungsweise. Als sense Primer wurde bei allen PCRs 474 verwendet.

Um die Unterschiede in den AS-Sequenzen der oben aufgeführten Rezeptoren herauszufinden, wurden diese mit Hilfe des Programms „MegAlign™“ nach dem ClustalW Algorithmus [69] miteinander verglichen (siehe Abb. 5-5, S.71, Abb. 5-6, 5-7, S.72). Die neu identifizierten CHIR-B2, -B3 und -B4 unterschieden sich in 58 % der AS-Sequenz vom publizierten CHIR-B1, CHIR-A2 und -A3 waren in 54 % der AS-Sequenz unterschiedlich zu

CHIR-A1 und CHIR-AB1 und -AB2 unterschieden sich in 22 % ihrer AS-Sequenz voneinander.

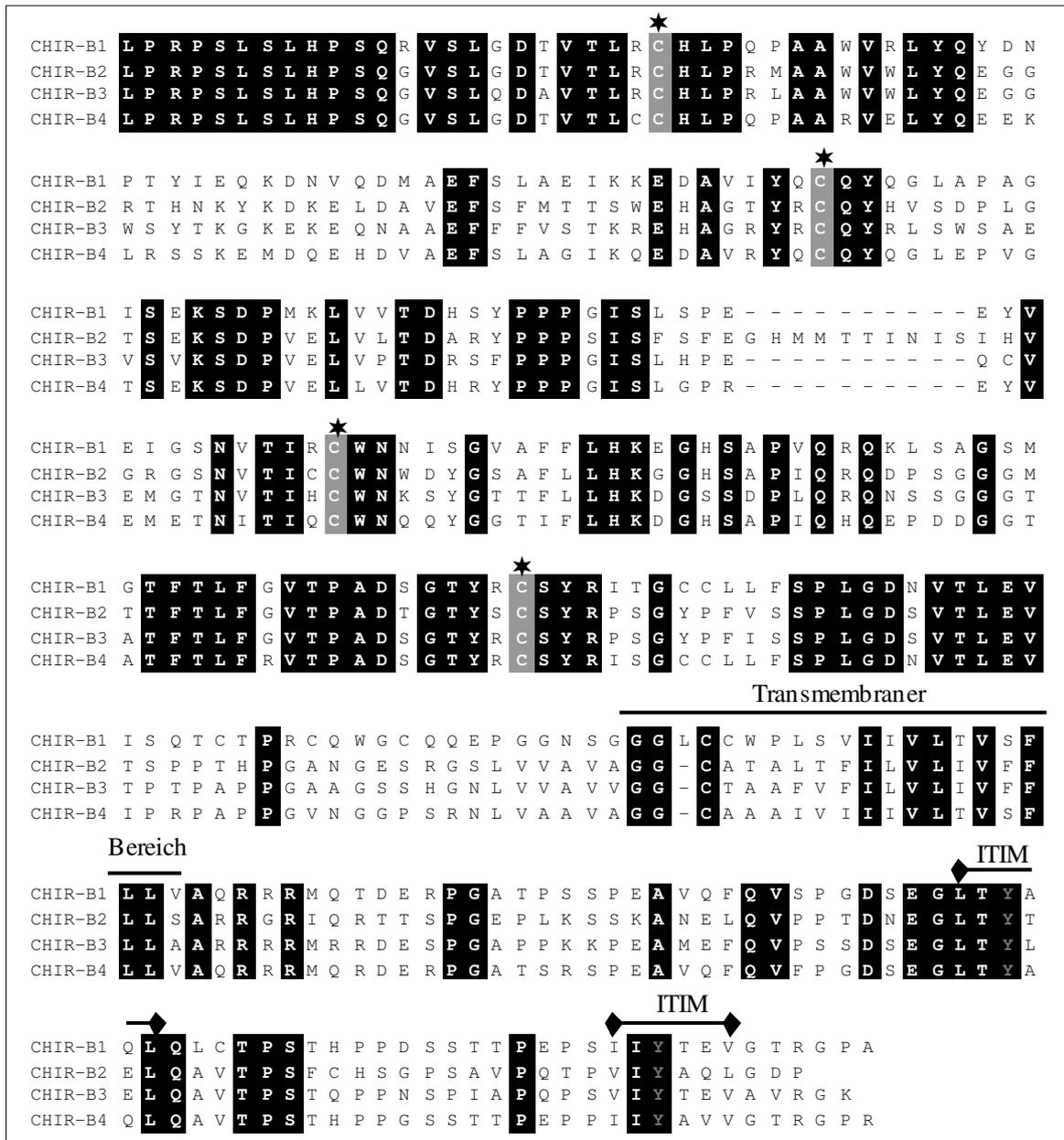


Abb. 5-5: Vergleichende Analyse der AS-Sequenzen aller inhibitorischen Rezeptoren (CHIR-B1, -B2, -B3 und -B4) ohne Angabe des Signalpeptids. Die in allen vier Rezeptoren identischen AS wurden schwarz hinterlegt. Die Strukturmerkmale eines inhibitorischen Rezeptors, wie die ITIMs, aber auch der transmembrane Bereich und die Cysteine (*), die die Ig-Domänen bilden wurden besonders hervorgehoben.

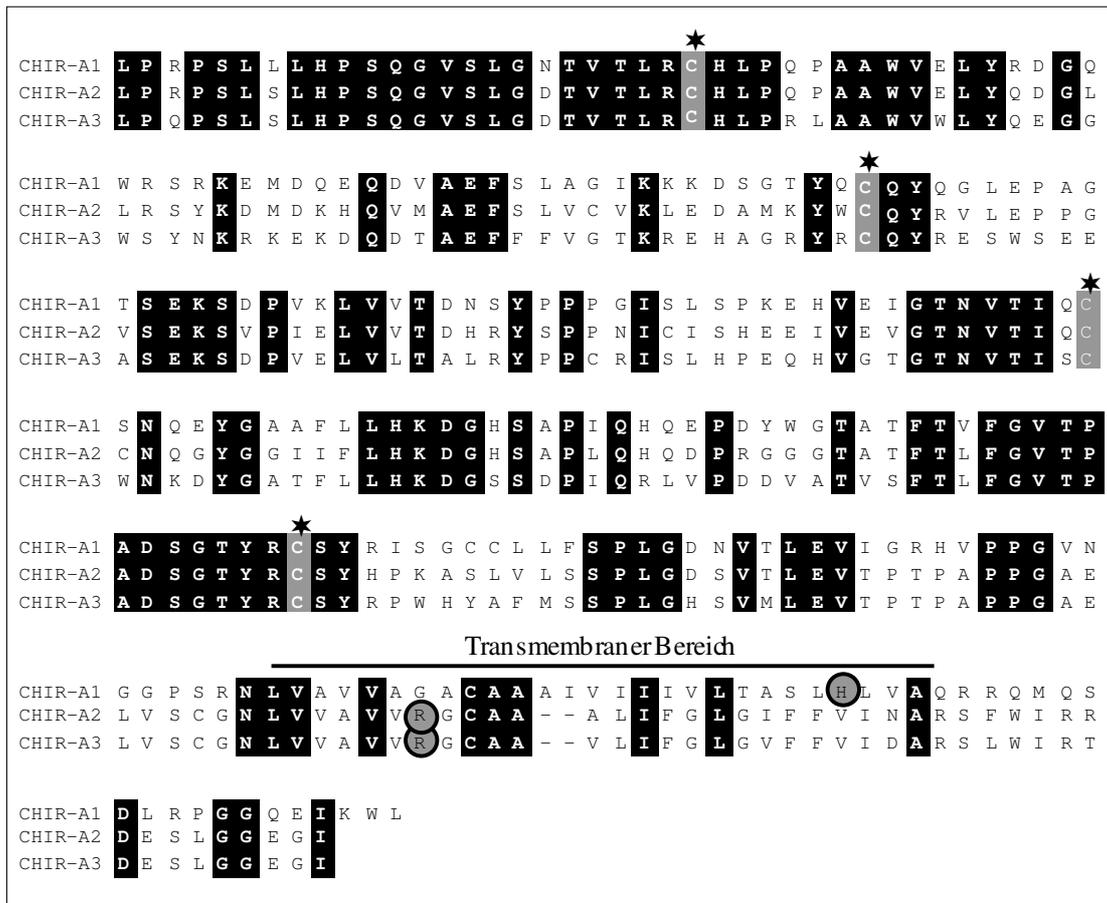


Abb. 5-6: Vergleichende Analyse der AS-Sequenzen aller aktivierenden Rezeptoren (CHIR-A1, -A2, und -A3) zusätzlich zu den in Abb. 5-5 beschriebenen Merkmalen wurde die positiv geladene AS (O) im transmembranen Bereich besonders hervorgehoben.

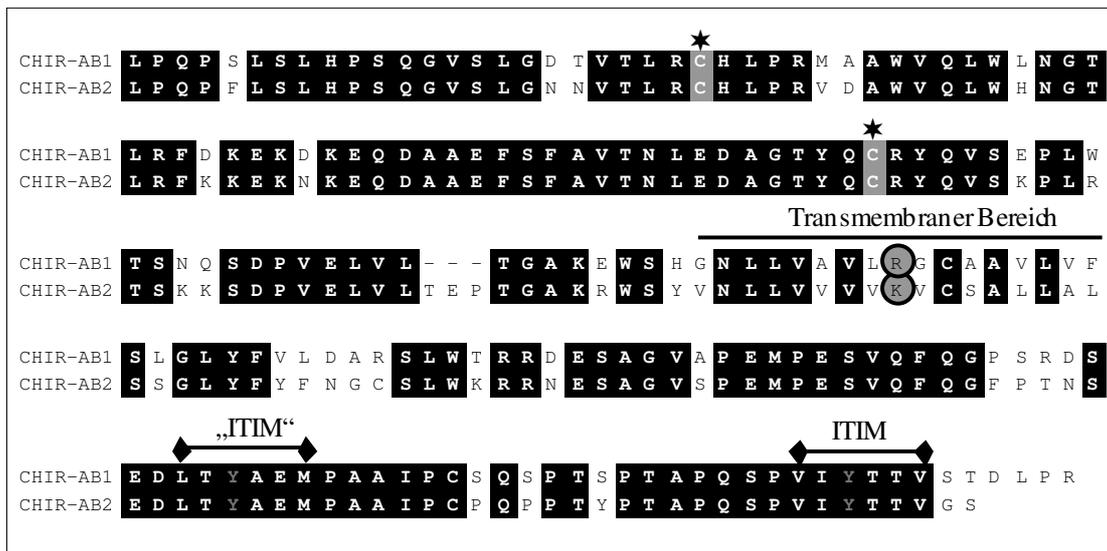


Abb. 5-7: Vergleichende Analyse der AS-Sequenzen von CHIR-AB1 und CHIR-AB2 ohne Angabe des Signalpeptids. Die Beschriftung erfolgte wie in Abb. 5-5 und 5-6 beschrieben. Die ITIM-ähnliche Sequenz wurde mit Hochkommas gekennzeichnet.

5.1.7 Allgemeine Merkmale der AS-Struktur von CHIR-B, -A und -AB

Zusammenfassend konnten alle genannten CHIR drei verschiedenen Rezeptortypen zugeteilt werden. CHIR-B bezeichnet inhibitorische Rezeptoren mit zwei Ig-Domänen vom C2 Typ und zwei ITIMs im Abstand von 24 AS im zytoplasmatischen Teil. CHIR-A steht für eine Gruppe von aktivierenden Rezeptoren mit zwei Ig-Domänen vom C2 Typ, einer positiv geladenen AS im transmembranen Bereich und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil. CHIR-AB besteht aus potenziell aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren mit einer Ig-Domäne vom C2 Typ, einer positiv geladenen AS im transmembranen Bereich und einem langen zytoplasmatischen Bereich mit einem ITIM. (siehe Abb. 5-8)

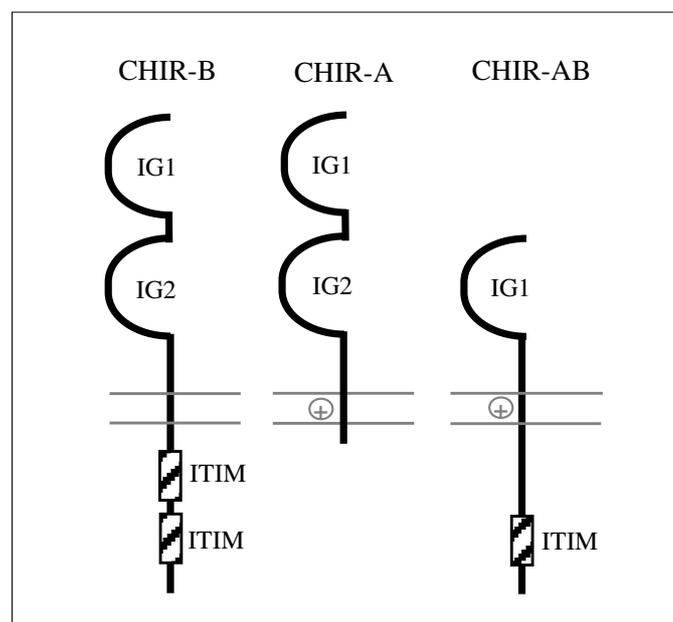


Abb. 5-8: Schematische Darstellung der identifizierten CHIR Typen. Die Ig-Domänen werden als Halbkreise dargestellt, die transmembrane Region mit einer positiven AS mit einem \oplus markiert und schraffierte Rechtecke symbolisieren die ITIMs.

5.2 Genomische Analyse

Um die Exon/Intron Strukturen der identifizierten Rezeptoren genauer zu untersuchen, wurde mit den spezifischen Primern für CHIR-B2 (474/475), für CHIR-A2 (474/556) und für CHIR-AB1 (474/485) eine PCR an genomischer DNA durchgeführt.

5.2.1 Analyse der Exon/Intron Strukturen von CHIR-B2, -A2 und -AB1

Bei CHIR-B2 ergab sich eine ca. 2000 bp lange Sequenz, die aus 7 Exons bestand (siehe Abb. 5-9). Exon 1 und 2 kodierten für das Signalpeptid während Exon 3 und 4 jeweils für eine Ig-Domäne kodierten. Anschließend folgte das Exon mit dem transmembranen Bereich, das nächste Exon kodierte für ein kurzes zytoplasmatisches Stück und auf dem letzten Exon lagen beide ITIMs.

Die genomische Sequenz von CHIR-A2 war wesentlich kürzer mit nur 1200 bp; sie bestand aus nur 5 Exons (siehe Abb. 5-10, S.75). Exon 1 - 4 verhielten sich wie bei CHIR-B2. Das letzte Exon kodierte für den transmembranen Bereich und den gesamten, sehr kurzen, zytoplasmatischen Anteil.

Die genomische Sequenz von CHIR-AB1 war 2049 bp lang und bestand aus 6 Exons (siehe Abb. 5-11, S.75). Die Verteilung der verschiedenen Rezeptorbereiche auf die Exons entsprach der von CHIR-B2, mit der Ausnahme, dass CHIR-AB1 nur eine Ig-Domäne, also in dem Bereich nur ein Exon besaß. Bei der genomischen Sequenz fiel ein sehr langes drittes Intron auf. Genauere Untersuchungen der Sequenz ergaben ein Pseudoexon für eine potenzielle zweite Ig-Domäne an dieser Stelle.

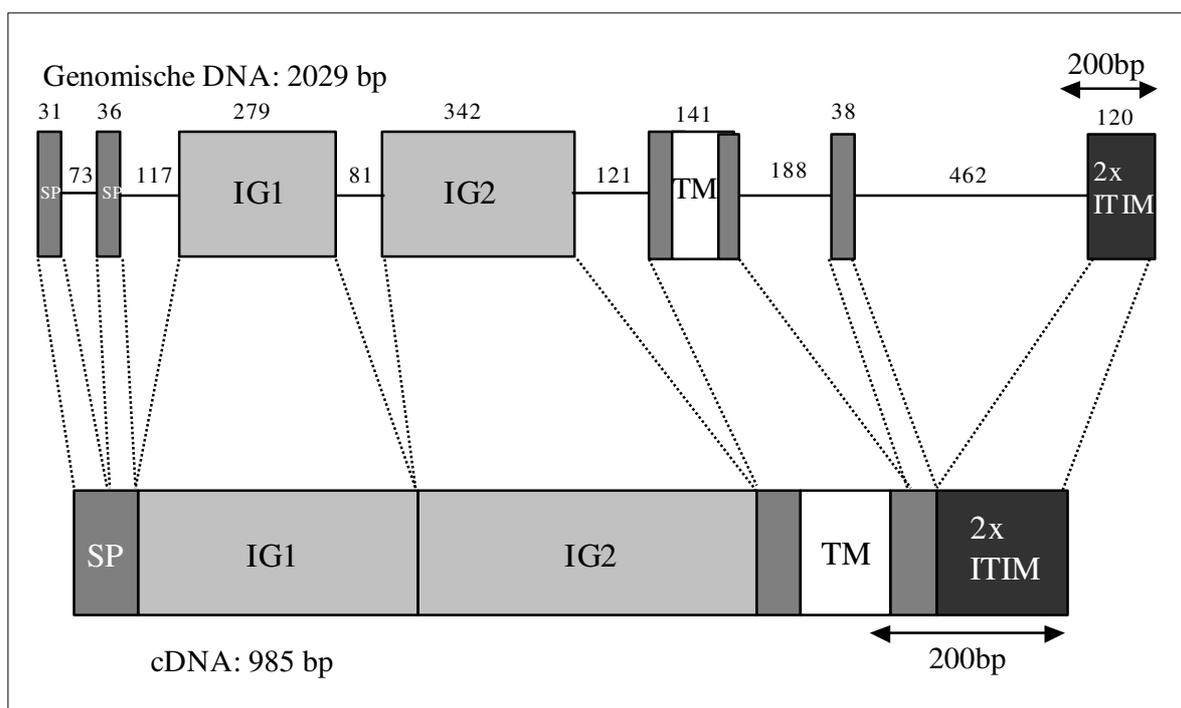


Abb. 5-9: Genomische Analyse von CHIR-B2. Die obere Reihe beschreibt die Exon/Intron Verteilung der verschiedenen Rezeptordomänen mit Angabe der Basepaaranzahl. Die untere Reihe entspricht der korrespondierenden cDNA. „SP“ steht für Signalpeptid, „IG“ für Ig-Domäne, „TM“ für den transmembranen Bereich und „2 x ITIM“ für den zytoplasmatischen Anteil, der die ITIMs enthält.

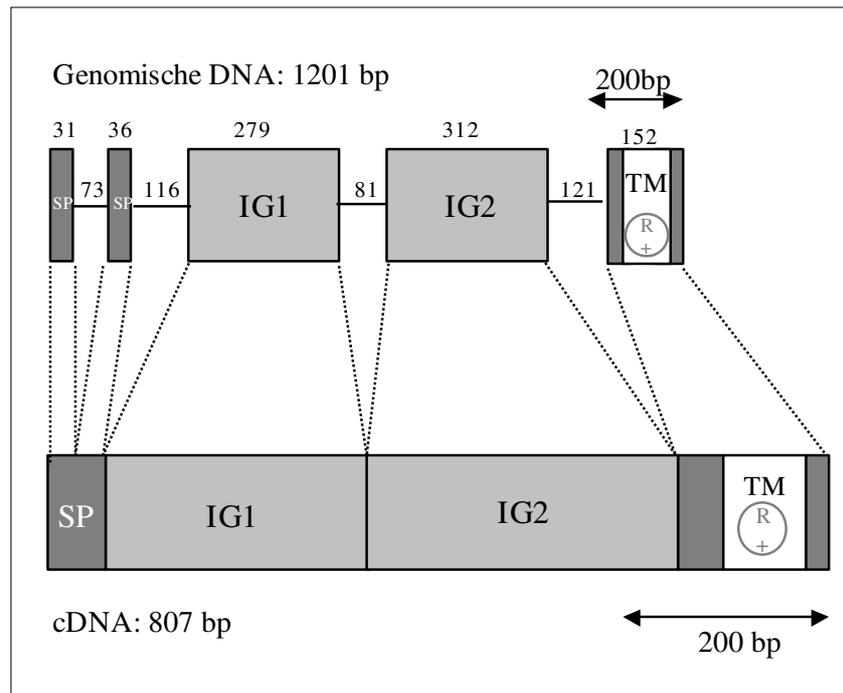


Abb. 5-10: Darstellung der Exon/Intron Struktur von CHIR-A2 wie in Abb. 5-9 beschrieben.

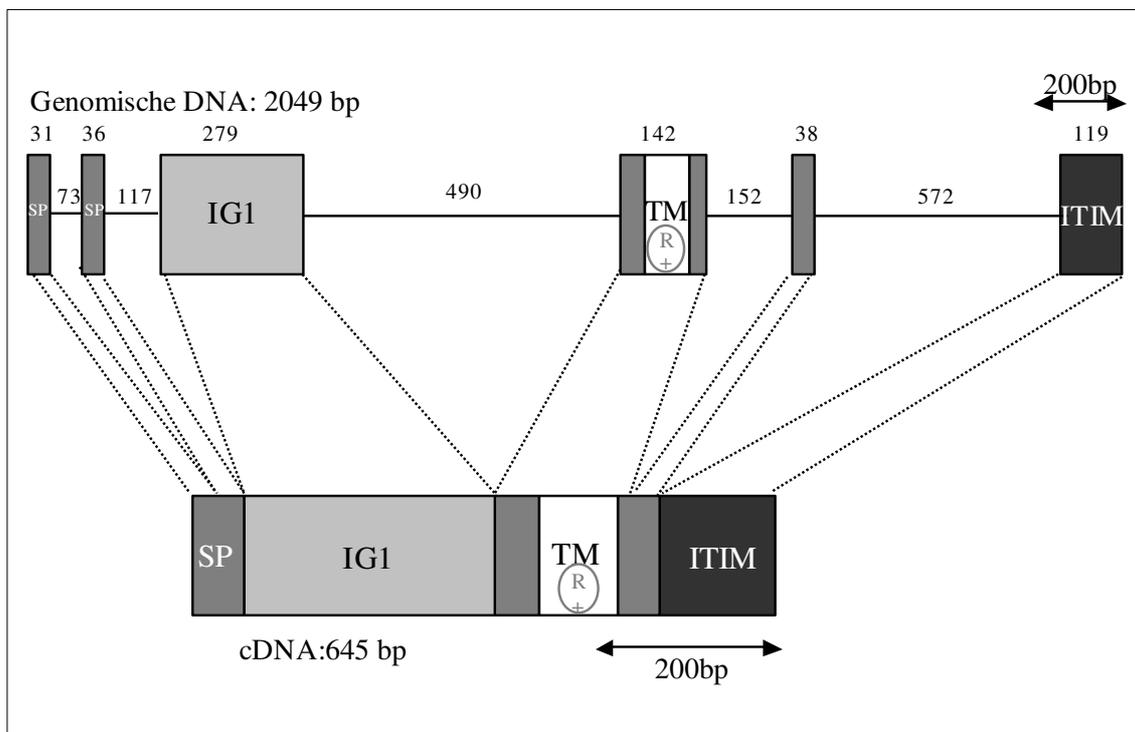


Abb. 5-11: Genomische Analyse von CHIR-AB1. Die Darstellung erfolgte wie in Abb. 5-9 beschrieben.

5.2.2 Analyse der Exon/Intron Übergänge

Bei genauerer Untersuchung der Exon/Intron Übergänge in den identifizierten genomischen Sequenzen ergab sich ein konsistentes Muster (siehe Tab. 5-2). Alle Intron Sequenzen besaßen am 5' Ende die Basen Guanin und Thymin und am 3' Ende Adenin und Guanin. Außerdem fiel auf, dass die Exons, die für den extrazytoplasmatischen und transmembranen Bereich kodierten, in Phase 1 lagen, alle zytoplasmatischen Exons in Phase 0. Die jeweilige Phase bestimmen die am 3' Ende eines Exons gelegenen Basen, die für die letzte AS (fettgedruckt) auf diesem Exon kodieren. Ist nur die erste Base dieser AS dort vorhanden, ist das Exon in Phase 1, sind zwei Basen vorhanden in Phase 2 und wenn das gesamte Triplet am 3' Ende liegt, ist dieses Exon in Phase 0.

Exon/Intron Übergänge von CHIR-B2

Rezeptordomäne	3'Intron Sequenz	Exon Sequenz		5' Intron Sequenz	
Signalpeptid		ATGGC MetAl	Exon1	CTGG Leu G	gt gag
Signalpeptid	tgc ag	GTTGG ly Trp	Exon2	CAAC Gln L	gt gag
Ig-Domäne 1	cct ag	TGCCC eu Pro	Exon3	ACAG Thr A	gt gag
Ig-Domäne 2	cac ag	ATGCA sp Ala	Exon4	CCAG Pro G	gt agg
Transmembraner Bereich	cac ag	GTGCC ly Ala	Exon5	CCTG Pro G	gt gag
Zytoplasmatischer Bereich	ccc ag	GTGAA ly Glu	Exon6	CCAG u Gln	gt aag
ITIMs	ccc ag	GTGCC ValPr	Exon7	TCCT pPro	

Exon/Intron Übergänge von CHIR-A2

Rezeptordomäne	3'Intron Sequenz	Exon Sequenz		5' Intron Sequenz	
Signalpeptid		ATGGC MetAl	Exon1	CTGG Leu G	gt gag
Signalpeptid	tgc ag	GTTGG ly Trp	Exon2	CAAC Gln L	gt gag
Ig-Domäne 1	cct ag	TGCCC eu Pro	Exon3	ACAG Thr A	gt gag
Ig-Domäne 2	tgc ag	ATCGC sp Arg	Exon4	CCAG Pro G	gt agg
Transmembraner Bereich	cac ag	GCGCT ly Ala	Exon5	TTAG Stopp	

Die Beschreibung von Tab. 5-2 befindet sich auf S.77.

Exon/Intron Übergänge von CHIR-AB1

Rezeptordomäne	3'Intron Sequenz	Exon Sequenz	5' Intron Sequenz	
Signalpeptid		ATGGC MetAl	Exon1 CTGG Leu G	gt gag
Signalpeptid	tgc ag	GTTGG ly Trp	Exon2 CAAC Gln L	gt gag
Ig-Domäne 1	cct ag	TGCCC eu Pro	Exon3 ACAG Thr G	gt gag
Transmembraner Bereich	cac ag	GTGCC ly Ala	Exon4 GCTG Ala G	gt gag
Zytoplasmatischer Bereich	tgc ag	GTATC ly Ile	Exon5 CCAG e Gln	gt aag
ITIMs	tcc ag	GGGCC GlyPr	Exon6 CTGA Stopp	

Tab. 5-2: Exon/Intron Übergänge der identifizierten genomischen Sequenzen. Alle Intron Sequenzen begannen am 5' Ende mit gt und endeten am 3' Ende mit ag. Alle extrazytoplasmatischen und transmembranen Exons befanden sich in Phase 1, alle zytoplasmatischen in Phase 0. (Erklärung des Begriffs „Phase“ siehe Text)

5.2.3 BAC (Bacterial Artificial Chromosome)-Analyse

Um herauszufinden, ob alle identifizierten CHIR Mitglieder einer Multigenfamilie sind, die auf einem relativ kurzen Abschnitt auf dem Chromosom kodiert, wurde eine sog. Hühner-BAC-Bibliothek untersucht. Die verwendete BAC-Bibliothek des Wageningen Instituts für Animal Sciences besteht aus 50000 verschiedenen Bakterienklonen, die in ihrem Plasmid verschiedene, bis zu 150 kb große DNA-Fragmente des Hühnerchromosoms enthalten und das Hühnergenom statistisch 5,5 fach repräsentieren. Zur Identifizierung des BAC Klons, der alle CHIR beinhaltet, wurden DNA-Pools dieser BAC-Bibliothek in Wageningen mit dem zur Verfügung gestellten Primerpaar 550/549 (siehe Abb. 5-3, S.68) durch ein zweidimensionales PCR-Screening durchsucht, und vier verschiedene BAC Klone als Plasmide zurückgesendet [70].

Diese wurden mit den für die verschiedenen CHIR spezifischen Primern (siehe Abschnitt 5.1.6, S.70) durch PCR getestet. Wie in Abb. 5-12 auf S.78 zu sehen, enthielt der BAC Klon 093H17 alle aufgeführten CHIR. (Die PCR für CHIR-A1 wurde nicht durchgeführt.) Bei CHIR-AB1 und -AB2 wurden zwei Sequenzen amplifiziert. Bei der kürzeren Sequenz handelt es sich um ein PCR-Artefakt mit einer Deletion von 200 bp. Alle getesteten CHIR lagen also auf einem gemeinsamen, relativ kurzen chromosomalem Abschnitt, den dieser BAC enthielt.

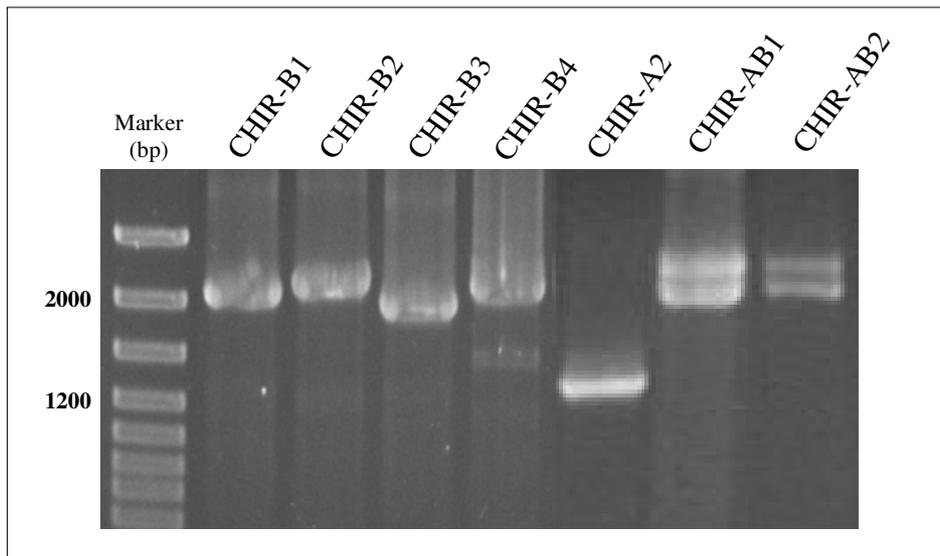


Abb. 5-12: PCR mit CHIR-spezifischen Primern auf BAC Klon 093H17. Von allen getesteten CHIR konnte eine PCR-Bande in der genomischen Länge amplifiziert werden. Bei CHIR-AB1 und -AB2 wurden zwei Sequenzen amplifiziert, wobei es sich bei der kürzeren Sequenz um ein PCR-Artefakt handelt.

5.3 Northern Blot Analyse

Um das Expressionsmuster von CHIR-B2, CHIR-A2 und CHIR-AB1 zu ermitteln, wurde die Gesamt-RNA von den in Abb. 5-13 aufgeführten Geweben und Zelllinien präpariert und auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA auf eine Nylonmembran übertragen und mit den spezifischen radioaktiv markierten Sonden für CHIR-B2, CHIR-A2 und CHIR-AB1 hybridisiert (siehe Abb. 5-14, S.79). Als Kontrolle der RNA-Menge und Integrität wurde mit der Sonde für GPDH hybridisiert.

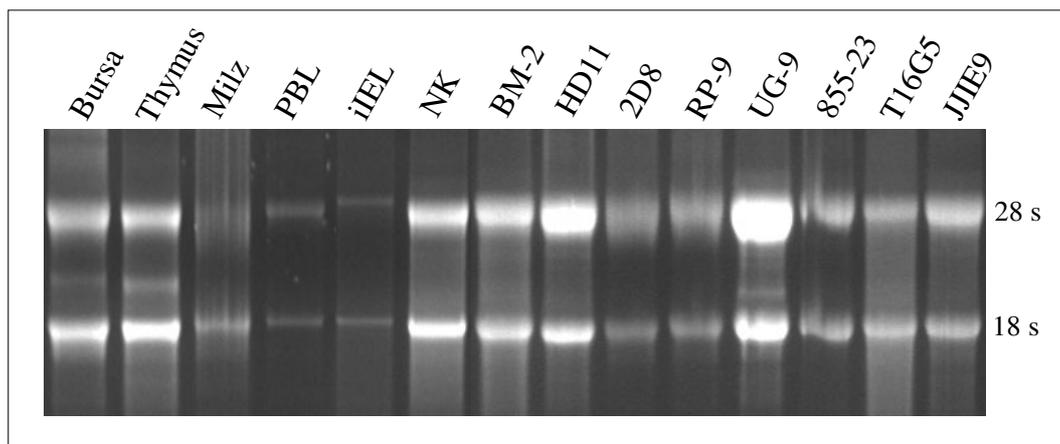


Abb. 5-13: Darstellung der im Northern Blot verwendeten RNAs. Die Abbildung zeigt die durch Ethidiumbromid angefärbte RNA nach elektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht. Die 28 s und 18 s Bande der in großen Mengen vorhandenen ribosomalen RNA sind zu erkennen. Dies diente zur Kontrolle der Integrität der RNA vor der Übertragung auf die Nylonmembran

Der Northern Blot zeigte, dass in mRNA von Bursa, Milz, iIEL, NK-Zellen, BM-2, HD11, 2D8 und RP-9 Transkripte für alle drei Rezeptoren enthalten waren, in PBL und 855-23 für CHIR-B2 und CHIR-A2, in UG-9 nur für CHIR-B2 und in T16G5 und JJ1E9 keiner. Die Mehrfachbanden in Bursa, Milz, PBL, iIEL und NK-Zellen bei CHIR-B2 weisen auf alternative Splicevarianten hin.

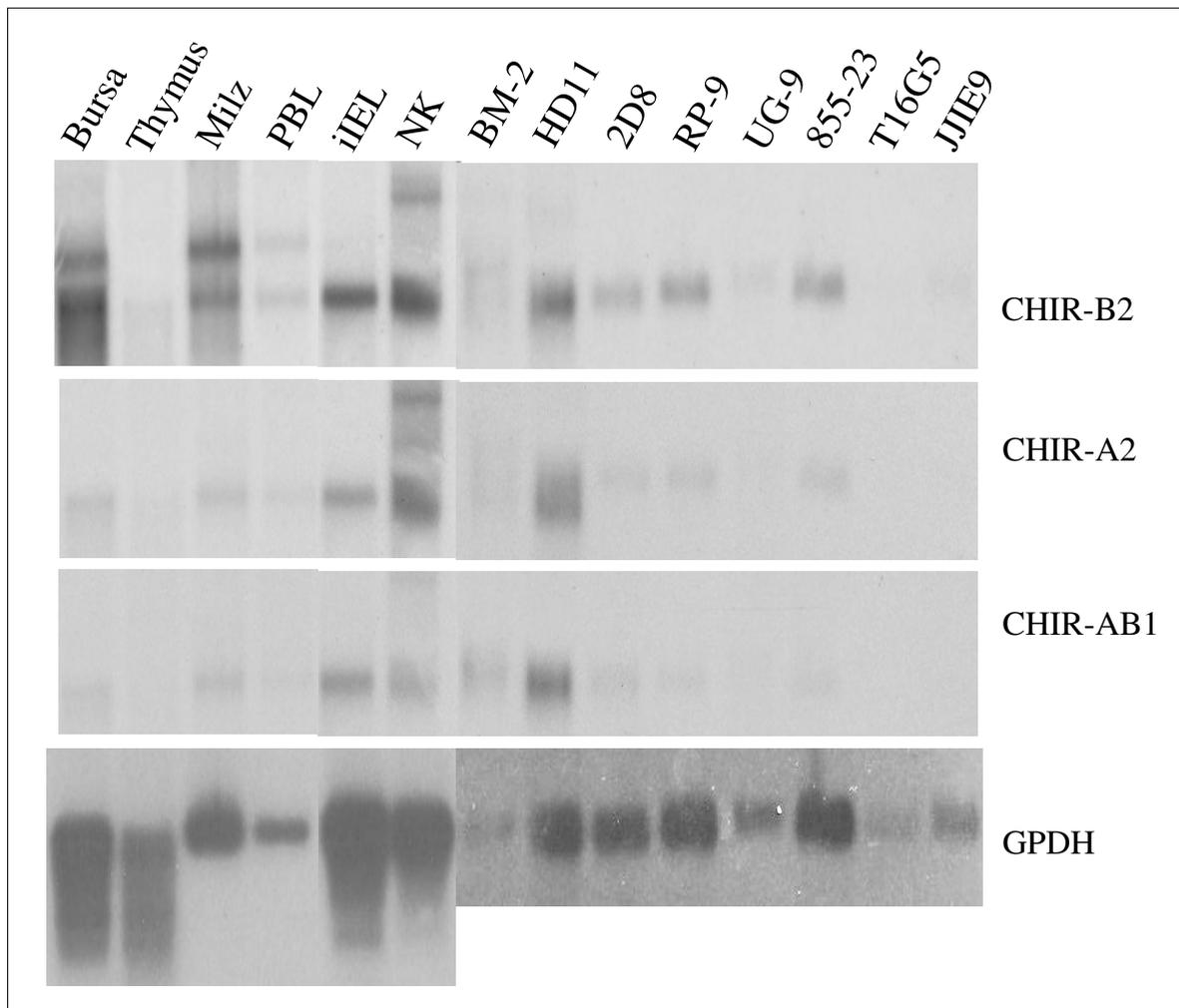


Abb. 5-14: Ergebnis der Northern Blot Analyse.

5.4 RT-PCR Analyse

Um die im Northern Blot erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde von denselben Geweben cDNA präpariert und diese durch PCR mit spezifischen Primern für CHIR-B2, CHIR-A2 und CHIR-AB1 analysiert. (siehe Abschnitt 5.1.6, S.70) Zur Kontrolle der cDNA wurde eine PCR mit β -Aktin Primern (17/18) durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Abb. 5-15 auf S.80 zu sehen. Transkripte von CHIR-B2 waren in Bursa, Milz, PBL, iIEL und HD11 detektierbar; Transkripte von CHIR-A2 in Bursa, PBL,

NK-Zellen, BM-2, HD11, 2D8 und RP-9 und Transkripte von CHIR-AB1 in Bursa, Milz, PBL, iIEL, NK-Zellen, BM-2, HD11, 2D8, RP-9, UG-9 und 855-23.

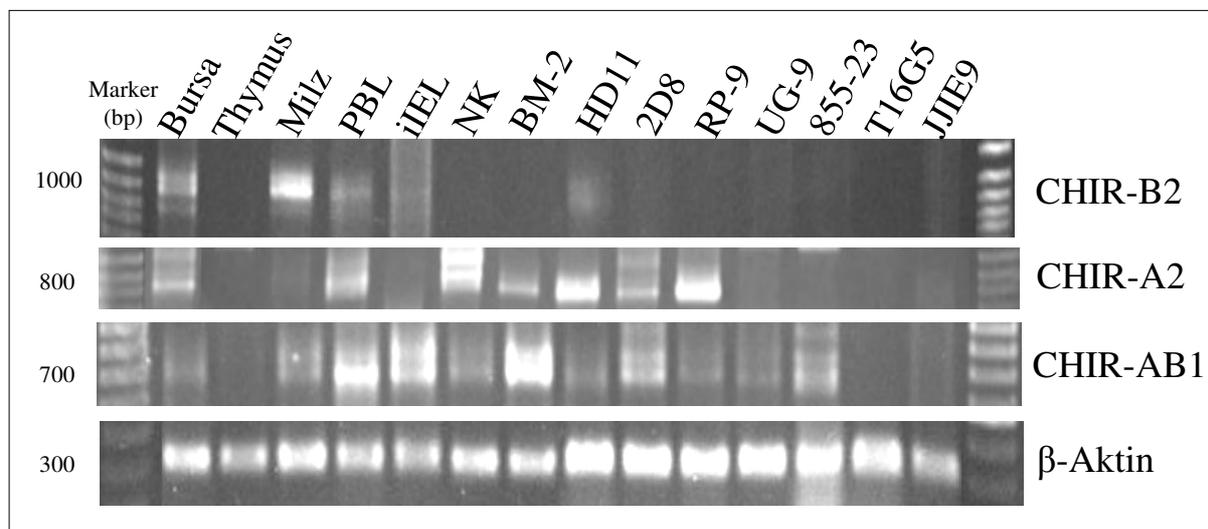


Abb. 5-15: RT-PCR zur Gewebeverteilung von CHIR.

5.5 Analyse des Expressionsmusters mit Hilfe der Durchflusszytometrie

In der Northern Blot Analyse bzw. PCR konnten nur Aussagen über die Transkription der verschiedenen Rezeptoren gemacht werden. Für die Analyse der Proteinexpression und weitere funktionelle Studien wurde ein spezifischer mAk hergestellt. Dadurch konnte auf unterschiedlichen Geweben und Zelllinien das Expressionsmuster von CHIR-B2 bzw. CHIR-AB1 identifiziert werden.

5.5.1 Herstellung von spezifischen mAk

Die Herstellung eines spezifischen mAk soll am Beispiel des Anti-CHIR-B2 exemplarisch dargestellt werden.

Eine Balb/c Maus wurde mit 293T-Zellen, die transient mit CHIR-B2-FLAG-Konstrukt transfiziert wurden, immunisiert und nach der Fusion die Hybridomüberstände an stabil transfizierten 2D8-Zellen gescreent. Der mAk 3H7 reagierte nur mit den stabil transfizierten 2D8-Zellen, nicht aber mit untransfizierten 2D8. Die dazu durchgeführten Immunphänotypisierungen sind in Abb. 5-16 auf S.81 dargestellt. Auf ähnliche Weise wurde der spezifische mAk 8D12 gegen CHIR-AB1 hergestellt.

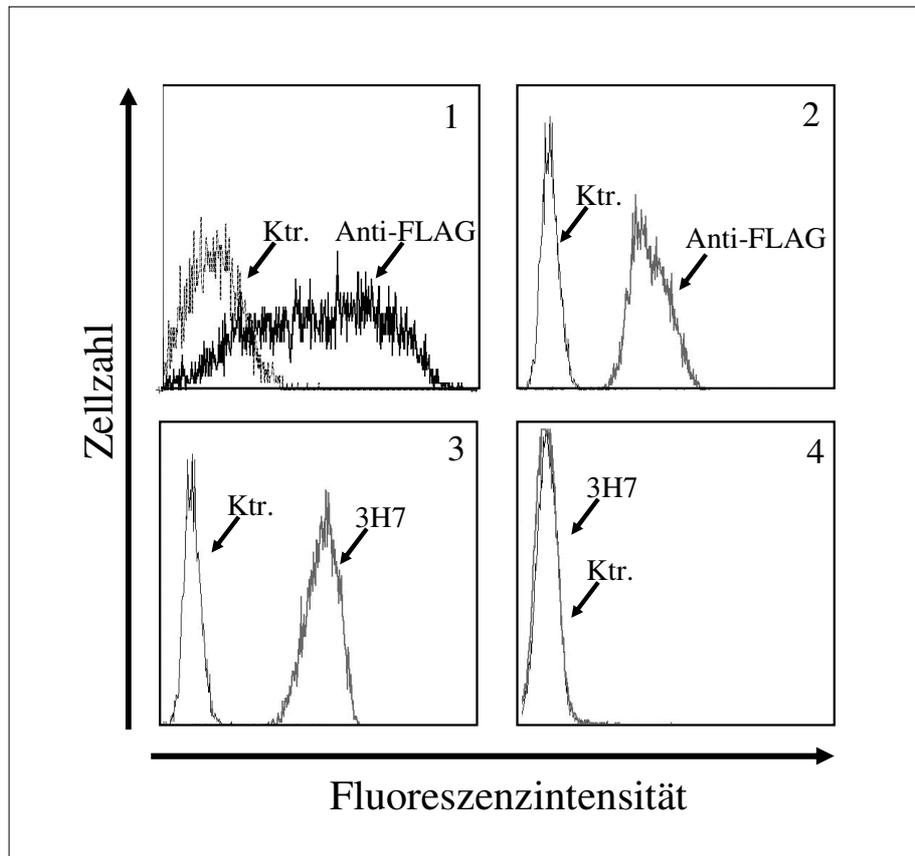


Abb. 5-16: Immunphänotypisierungen, die zur Herstellung des mAk 3H7 durchgeführt wurden. Als Kontrolle (Ktr.) wurde nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt. Bild 1 zeigt eine Anti-FLAG Färbung der zur Immunisierung verwendeten transient transfizierten 293T-Zellen. In Bild 2 ist die Expressionskontrolle mit Anti-FLAG von stabil transfizierten 2D8-Zellen zu sehen, die zum Testen der Hybridomüberstände verwendet wurden. Bild 3 zeigt den auf stabil transfizierten 2D8-Zellen positiv getesteten, spezifischen mAk 3H7. In Bild 4 sieht man, dass der mAk 3H7 nicht auf 2D8-Zellen selbst bindet.

5.5.2 Immunphänotypisierungen mit den spezifischen mAk

5.5.2.1 Einfachfärbungen

Zuerst wurden bei allen in Tab. 5-3 aufgeführten primären Zellen und Zelllinien Einfachfärbungen mit 3H7 bzw. 8D12 durchgeführt. Um festzustellen, ob CHIR-B2 bzw. CHIR-AB1 schon während der Ontogenese exprimiert werden, wurden Bursa B-Zellen vom Embryonaltag 18 präpariert und gefärbt. Das Ergebnis ist in Tab. 5-3 auf S.82 zusammengefasst. Die 8D12-positiv gefärbten Makrophagen und Zelllinien sind in Abb. 5-17 auf S.83 dargestellt.

Primäre Zellen	3H7 (α-CHIR-B2)	8D12 (α-CHIR-AB1)
Bursa	97,4 %	91,3 %
Bursa Embryonaltag 18	81,8 %	79,4 %
Thymus	0 %	0 %
Milz	24,2 %	25,6 %
ConA Blasten	0 %	0 %
PBL	12,5 %	9,8 %
Makrophagen	0 %	100 %
LPS stim. Makrophagen	0 %	100 %
IFN γ stim. Makrophagen	0 %	100 %
Caecaltonsillen	22,5 %	29,8 %
iIEL	0 %	23,7 %
Knochenmark	0 %	10,1 %
Thrombozyten	0 %	nicht durchgeführt

Zelllinien (Zellart)	3H7	8D12
2D8 (B-Zellen)	0 %	0 %
RP9 (B-Zellen)	0 %	0 %
CU68 (B-Zellen)	0 %	0 %
DT40 (B-Zellen)	0 %	100 %
HD11 (Makrophagen)	0 %	100 %
BM-2 (Makrophagen)	0 %	100 %
UG9 (T-Zellen)	0 %	0 %
855-23 (T-Zellen)	0 %	0 %
T16G5 (NK-Zellen)	0 %	0 %
JJ1E9 (NK-Zellen)	0 %	0 %
HD3 (Erythrozyten)	0 %	0 %

Tab. 5-3: Aufstellung der durch Durchflusszytometrie getesteten primären Zellen und Zelllinien mit Angabe der positiven Zellen in % der Gesamtlumphozyten.

5.5.2.2 Doppelfärbungen

Die nach Einfachfärbung positiven primären Zellen wurden zur eindeutigen Identifizierung der Zellart doppelgefärbt. Dazu wurde zum einen, ein für B-Zellen spezifischer Antikörper (Anti-IgL bzw. Anti-Bu1), und zum anderen, ein für T-Zellen spezifischer (Anti-CD3) verwendet. Die Doppelfärbung ergab, dass sowohl CHIR-B2 als auch CHIR-AB1 in diesen Geweben auf B-Zellen exprimiert sind (siehe Abb. 5-18, S.84 und 5-19, S.85).

Außerdem konnten in der Milz 3 % CD3⁺ CHIR-B2⁺ und 10 % CD3⁺ CHIR-AB1⁺ Lymphozyten detektiert werden, die aber nicht näher charakterisiert wurden.

Zur weiteren Analyse der 8D12-positiven Zellen im Knochenmark bzw. iIEL wurde eine Doppelfärbung mit dem Antikörper 8F2, der auf Makrophagen bindet, bzw. einem für Darm-NK-Zellen spezifischen Antikörper (28-4) durchgeführt. Dadurch wurde gezeigt, dass CHIR-AB1 auf Knochenmarksmakrophagen und auf NK-Zellen bei iIEL positiv war.

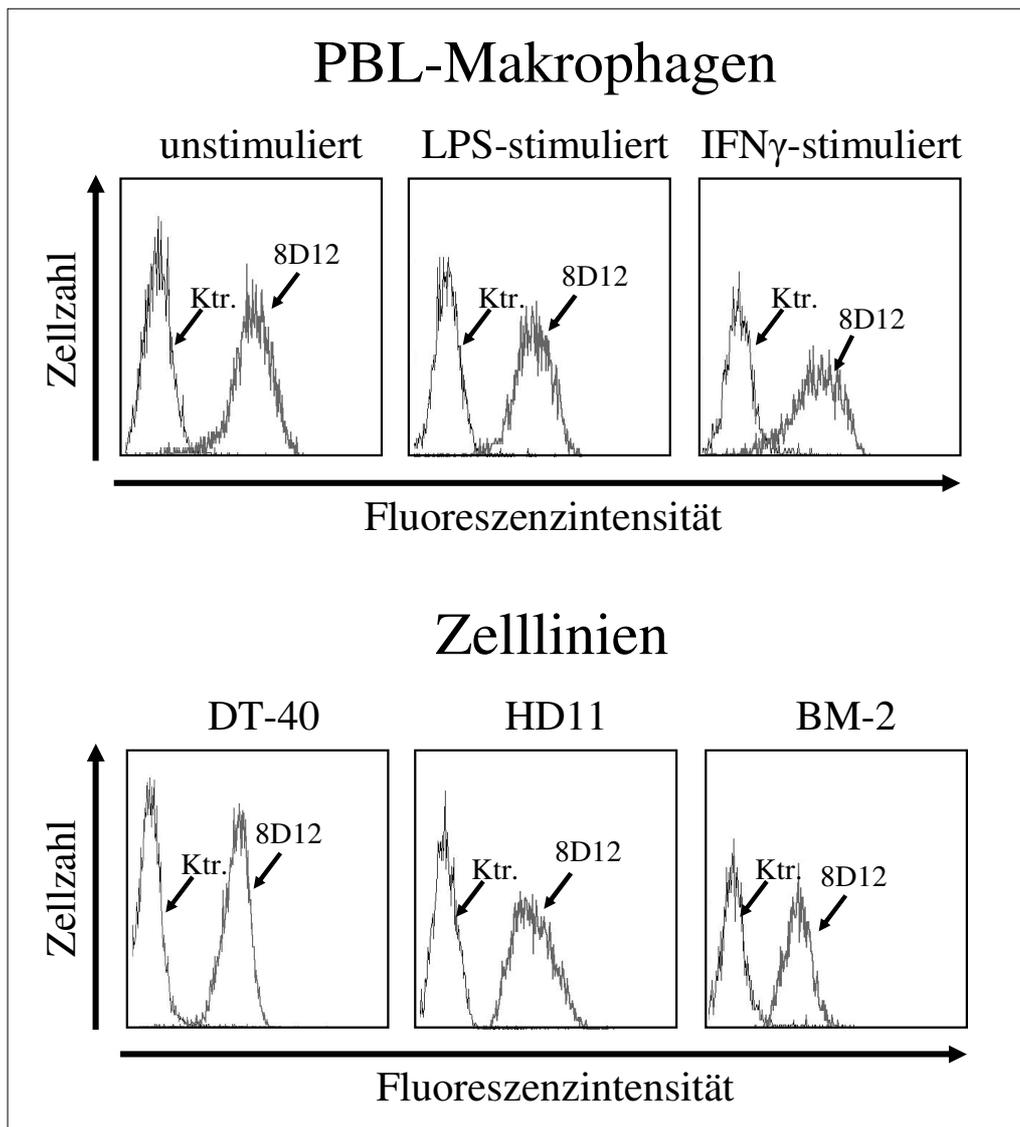


Abb. 5-17: Darstellung der Anti-CHIR-AB1 (8D12)-positiven Makrophagen und Zelllinien. Als Kontrolle wurde nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt.

5.5.3 Zusammenfassung der Immunphänotypisierungen

Zusammenfassend konnte folgendes Expressionsmuster identifiziert werden:

Der inhibitorische Rezeptor CHIR-B2 war vor allem auf B-Zellen exprimiert. Der potenziell aktivierende und inhibitorische Rezeptor CHIR-AB1 wurde auch auf B-Zellen und zusätzlich auf der B-Zelllinie DT-40 detektiert. Er befindet sich auch auf unstimulierten und stimulierten PBL-Makrophagen, auf Knochenmarksmakrophagen und auf den Makrophagenzelllinien HD11 und BM-2. Außerdem ist CHIR-AB1 auf NK-Zellen im Darm exprimiert.

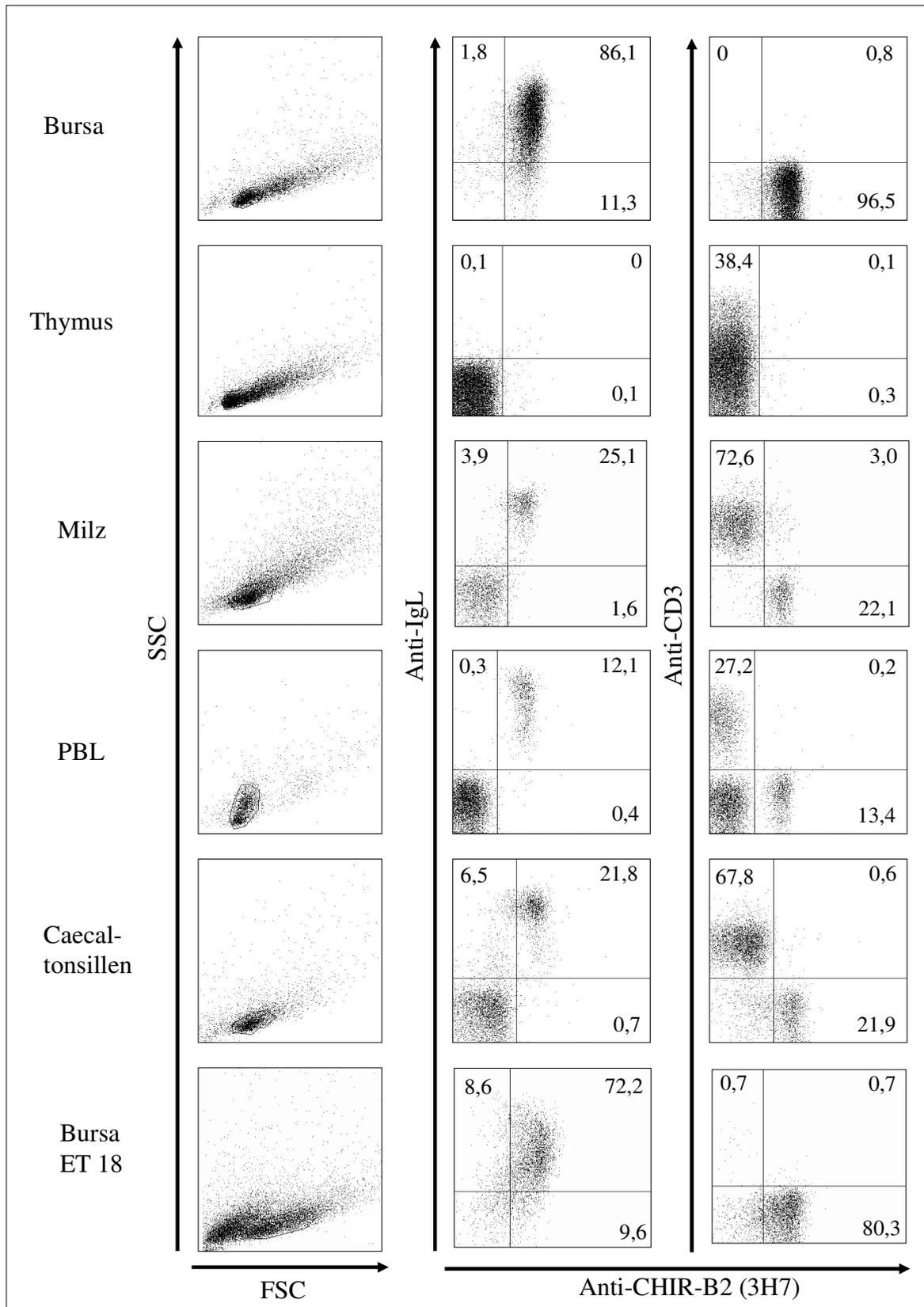


Abb. 5-18: Doppelfärbung mit Anti-CHIR-B2 (3H7). Die mittlere und die rechte Reihe zeigen Doppelfärbungen von Bursa, Thymus, Milz, PBL, Caecaltonsillen und Bursa am Embryonaltag (ET) 18 mit Anti-CHIR-B2 (3H7) und Anti-IgL bzw. Anti-CD3 Antikörpern. CHIR-B2 ist vor allem auf B-Zellen exprimiert. Die linke Reihe zeigt die im Streulicht dargestellten ausgewählten Lymphozyten.

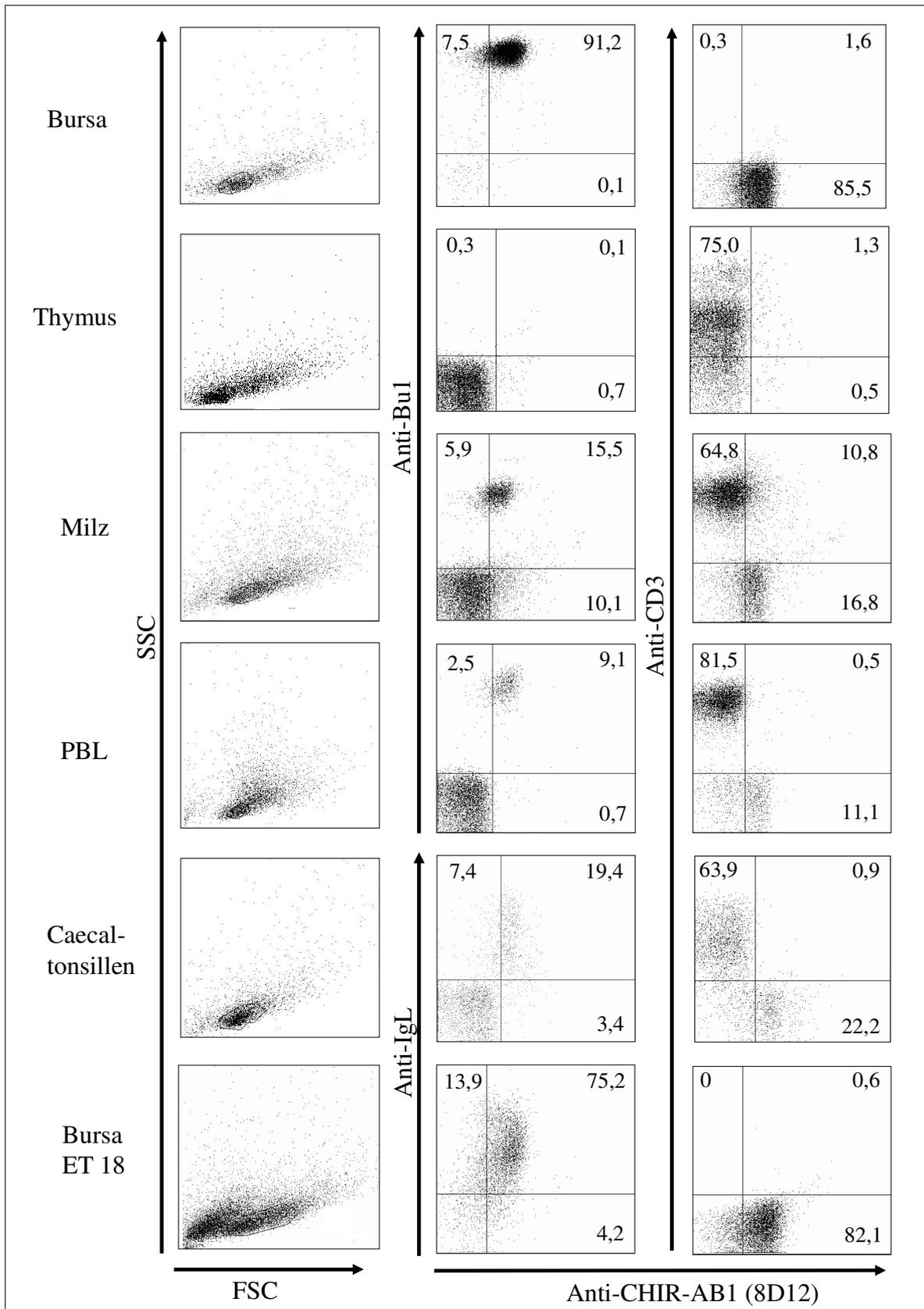


Abb. 5-19: Darstellung der Doppelfärbungen mit Anti-CHIR-AB1 (8D12) und B-Zell-spezifischen Anti-IgL bzw. Anti-Bu1 und T-Zell-spezifischen Anti-CD3 Antikörpern. CHIR-AB1 konnte auf allen B-Zellen und auf 10 % aller Milzlymphozyten detektiert werden, die aber nicht näher charakterisiert wurden.

5.6 Bestimmung der Molekulargewichte durch Western Blot Analyse

Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der CHIR wurden die stabil transfizierten Zelllinien bzw. primäre Zellen im Western Blot analysiert.

5.6.1 Western Blot Analyse von CHIR-B2

Zum einen wurde CHIR-B2 durch Anti-FLAG Immunpräzipitation von stabil transfizierten 2D8-Zellen und zum anderen durch 3H7 Immunpräzipitation von Bursa B-Zellen untersucht.

5.6.1.1 Proteindetektion mit Anti-FLAG-HRP

2D8 + CHIR-B2-FLAG Zellen wurden lysiert, mit dem Anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert und CHIR-B2-FLAG unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen und nach Deglykosilierung im Western Blot mit Anti-FLAG-HRP detektiert.

Das relative Molekulargewicht (M_R) von CHIR-B2 lag nach Deglykosilierung bei ca. 40 kDa, unter reduzierenden Bedingungen bei ca. 46 kDa und unter nicht reduzierenden bei ca. 46 kDa und ca. 75 kDa. CHIR-B2 wurde als Monomer, und zum Teil aber auch als Dimer exprimiert (siehe Abb. 5-20).

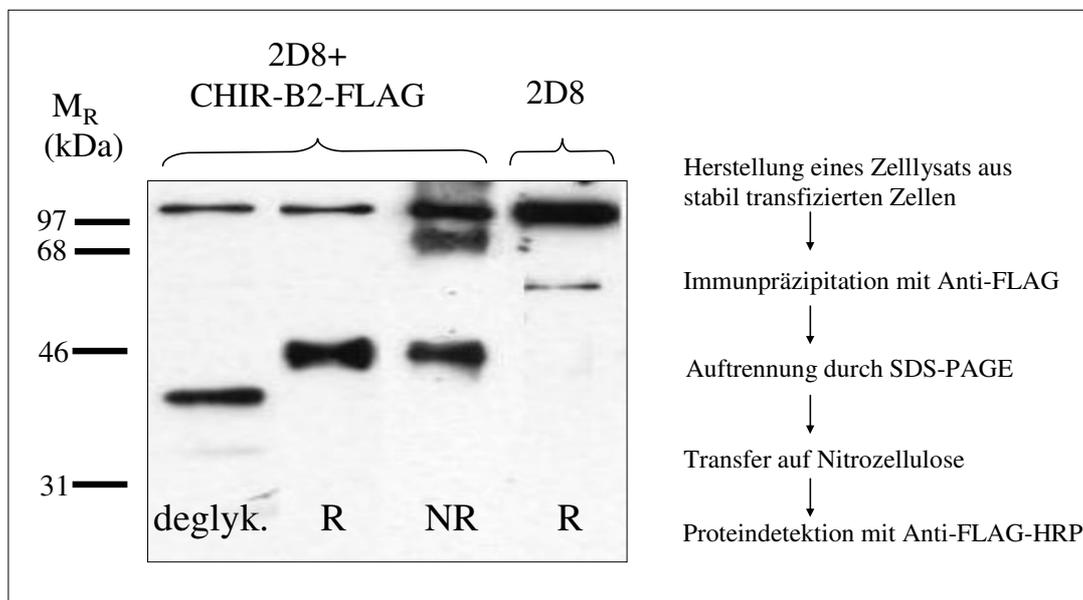


Abb. 5-20: Western Blot von stabil transfizierten 2D8-Zellen. Das M_R von CHIR-B2 lag nach Deglykosilierung (deglyk.) bei ca. 40 kDa und unter reduzierenden (R) und nicht reduzierenden (NR) Bedingungen bei ca. 46 kDa. Zusätzlich konnte unter NR noch eine Bande bei ca. 75 kDa detektiert werden. Immunpräzipitat von untransfizierten 2D8-Zellen diente zum Nachweis von unspezifischer Färbung des Anti-FLAG Antikörpers. Rechts ist zur besseren Verdeutlichung schematisch die Vorgehensweise bei der Western Blot Analyse dargestellt.

5.6.1.2 Proteindetektion mit SA-HRP

Die Detektion von biotinierten Oberflächenproteinen mit SA-HRP wurde verwendet, um zu beweisen, dass durch die Verwendung desselben Antikörpers (Anti-FLAG) in Immunpräzipitation und Proteindetektion keine Artefakte entstanden sind (siehe oben).

Stabil transfizierte 2D8-Zellen wurden oberflächenbiotiniert, mit Anti-FLAG immunpräzipitiert und mit SA-HRP im Western Blot gefärbt. Als Kontrolle wurden untransfizierte 2D8-Zellen ebenso behandelt. Es konnten dieselben Molekulargewichte von CHIR-B2 festgestellt werden, wie durch Detektion mit Anti-FLAG-HRP (siehe Abb. 5-21 linke Seite).

Um das M_R von CHIR-B2 auf primären Zellen darzustellen, wurden die in der Durchflusszytometrie positiven Bursa B-Zellen, oberflächenbiotiniert, mit dem Anti-CHIR-B2 (3H7) Antikörper immunpräzipitiert und mit SA-HRP im Western Blot detektiert. Als Negativkontrolle wurden die 3H7 negativen Thymuslymphozyten verwendet. Wie in Abb. 5-21 auf der rechten Seite zu sehen entspricht das Molekulargewicht in primären Zellen dem in der transfizierten 2D8-Zelllinie.

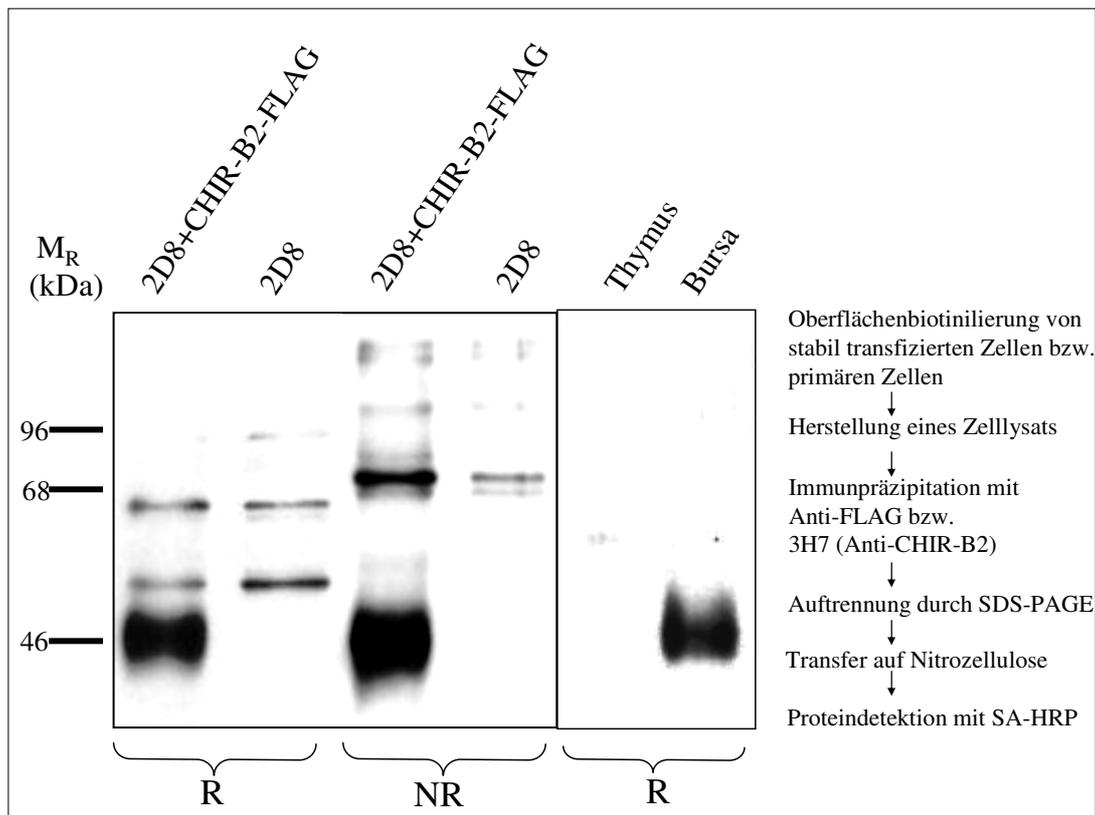


Abb. 5-21: Western Blot von oberflächenbiotinierten stabil transfizierten 2D8-Zellen bzw. Bursa B-Zellen. Bei 2D8 + CHIR-B2-FLAG und bei Bursa B-Zellen ergab sich ein M_R von ca. 46 kDa unter reduzierenden (R) Bedingungen. Bei stabil transfizierten 2D8-Zellen konnte unter nicht reduzierenden (NR) Bedingungen zusätzlich eine Bande bei ca. 75 kDa detektiert werden. Rechts ist zur besseren Verdeutlichung schematisch die Vorgehensweise der Western Blot Analyse von oberflächenbiotinierten Zellen zu sehen.

5.6.2 Western Blot Analyse von CHIR-A2 und CHIR-AB1

HD11-Zellen, die stabil mit CHIR-A2-FLAG Konstrukt bzw. CHIR-AB1-FLAG Konstrukt transfiziert waren, wurden mit Anti-FLAG immunpräzipitiert und im Western Blot mit Anti-FLAG-HRP analysiert. Wie in Abb. 5-22 zu sehen, lag das M_R von CHIR-A2 nach Deglykosilierung bei ca. 31 kDa und unter reduzierenden Bedingungen bei ca. 42 kDa. CHIR-AB1 hatte ein Molekulargewicht von 35 kDa nach Deglykosilierung und unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen war eine sehr starke Bande in der Größe von ca. 46 kDa und eine schwächere Bande von ca. 40 kDa zu erkennen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten CHIR-A2 und CHIR-AB1 nicht dargestellt werden.

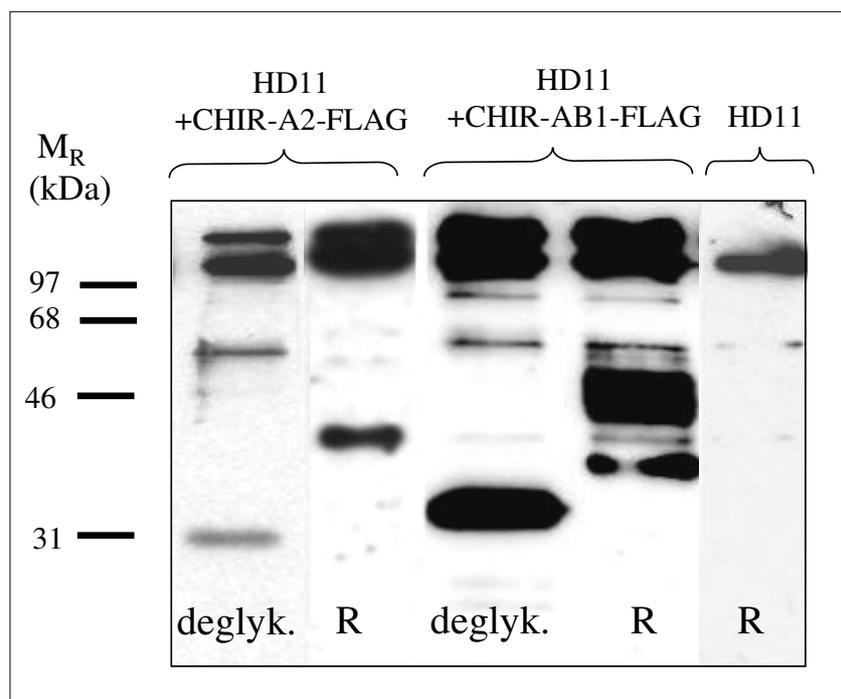


Abb. 5-22: Western Blot von stabil transfizierten HD11-Zellen nach Deglykosilierung (deglyk.) und unter reduzierenden Bedingungen (R). Immunpräzipitate von untransfizierten HD11-Zellen dienten zum Nachweis von unspezifischer Färbung des Anti-FLAG Antikörpers.

5.7 Nachweis von phosphorylierten ITIMs und SHP-1 und -2

Stabil transfizierte 2D8 + CHIR-B2-FLAG Zellen wurden 0, 5 bzw. 15 min. lang mit Pervanadat behandelt, Anti-FLAG Immunpräzipitate hergestellt und diese anschließend im Western Blot mit unterschiedlichen spezifischen Antikörpern analysiert. Es konnte dadurch nachgewiesen werden, dass die ITIMs im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors nach Aktivierung zunehmend phosphoryliert wurden und es zu einer Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 kam (siehe Abb. 5-23, S.89).

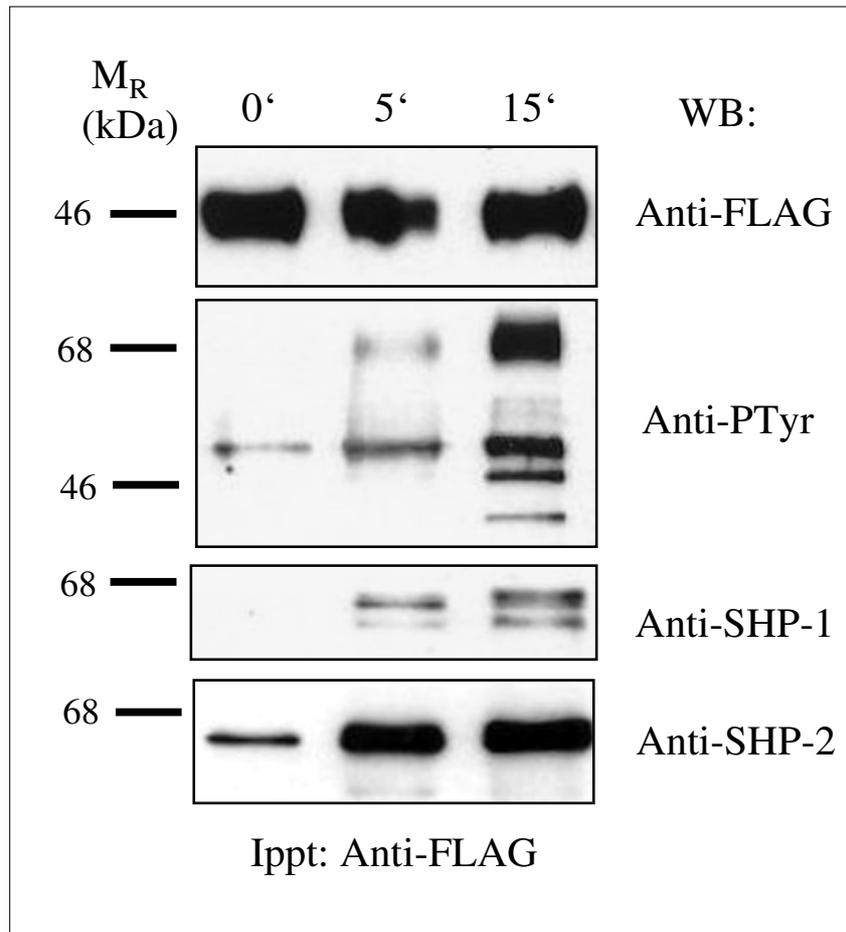


Abb. 5-23: Western Blot von unterschiedlich lang mit Pervanadat behandelten immunpräzipitierten 2D8 + CHIR-B2-FLAG Zellen. Die aufgetragenen Immunpräzipitate (Ippt) wurden mit den am rechten Bildrand aufgeführten Antikörpern (WB) detektiert. Die Färbung mit Anti-FLAG diente als Ladekontrolle.

5.8 Wachstumsinhibition von stabil transfizierten 2D8-Zellen

Durch Proliferationsassays mit stabil transfizierten 2D8 + CHIR-B2-FLAG Zellen wurde überprüft, inwieweit eine Stimulation von CHIR-B2 einen Effekt auf das Zellwachstum einer Zelllinie hat. Dazu wurden 96-Lochplatten zum einen mit dem spezifischen mAk 3H7, zum anderen mit einem irrelevanten Antikörper beschichtet, die Zellen darauf inkubiert, mit [³H]-Thymidin versetzt und gemessen. Wie in Abb. 5-24 auf S.90 zu sehen, kommt es bei einer Kreuzvernetzung von CHIR-B2 durch 3H7 zu einer starken Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu einem irrelevanten Antikörper bzw. ohne einen beschichteten Antikörper.

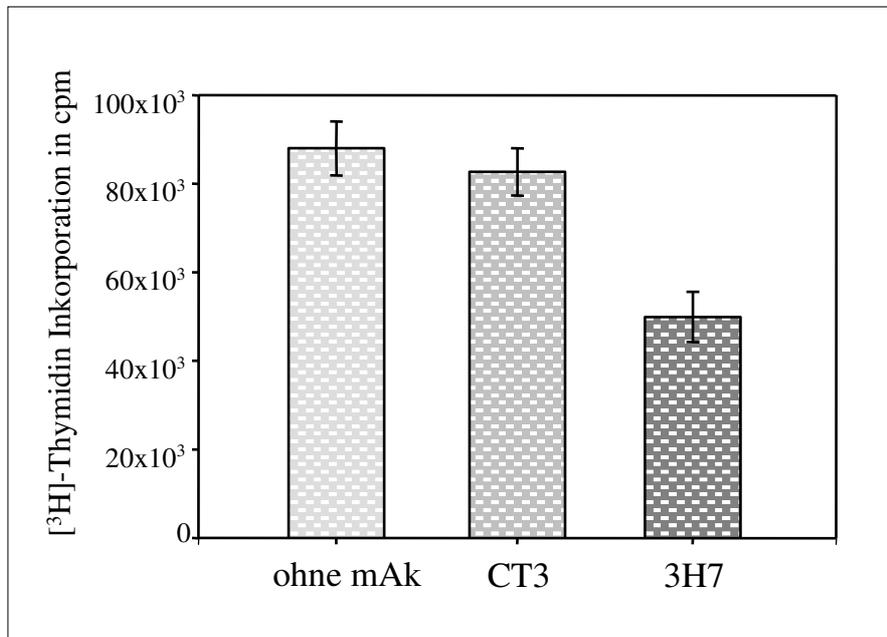


Abb. 5-24: Effekt von Anti-CHIR-B2 mAk (3H7) auf stabil transfizierte 2D8 + CHIR-B2-FLAG Zellen. Durch Kreuzvernetzung von CHIR-B2 kommt es zu einer starken Wachstumsinhibition, die im Proliferationsassay durch verminderten Einbau von [³H]-Thymidin nachgewiesen wurde. Bei einem irrelevanten Antikörper (CT3) bzw. ohne Antikörper ist keine Inhibition zu erkennen.

5.9 Nachweis der Konformation der huIg-Konstrukte

Um mögliche Liganden der hier charakterisierten Rezeptoren herauszufinden, wurden lösliche huIg-Konstrukte hergestellt, die an den Liganden binden können. Sie bestehen aus dem extrazellulären Anteil des jeweiligen Rezeptors und der CH₂ und CH₃ Ig-Domäne des humanen IgG Moleküls. Sie wurden entsprechend kloniert, 293T-Zellen damit transient transfiziert und aus dem Überstand dieser durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Auf diese Weise wurden CHIR-B2-huIg, CHIR-A2-huIg und CHIR-AB1-huIg hergestellt. CHIR-B2-huIg und CHIR-AB1-huIg konnten mit dem spezifischen mAk im ELISA detektiert werden (siehe Abb. 5-25, S.91). Dies ist ein Beweis, dass die Konformation dieser Konstrukte der von primären Zellen entspricht, da diese durch die spezifischen mAk, die auf primären Zellen binden, nachgewiesen werden konnten.

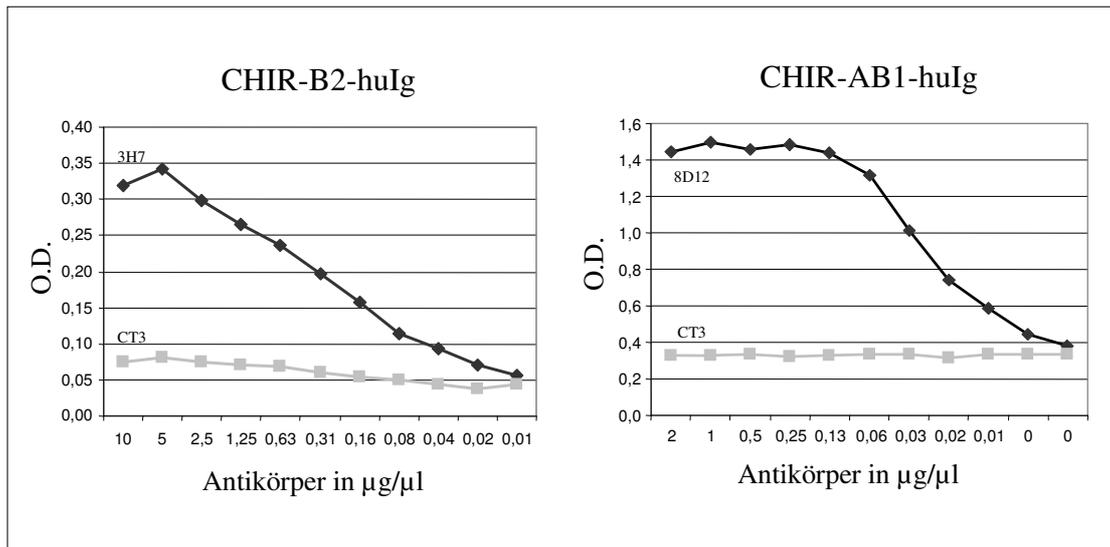


Abb. 5-25: ELISA zum Nachweis der Konformation der huIg-Konstrukte. CHIR-B2-huIg wurde durch den spezifischen mAk 3H7 detektiert und CHIR-AB1-huIg durch 8D12. Als Negativkontrolle diente die Färbung mit einem irrelevanten Antikörper (CT3).

6 Diskussion

6.1 Zuordnung der identifizierten CHIR zu einer Multigenfamilie

Im Rahmen dieser Dissertation wurden sieben verschiedene Ig-like Rezeptoren beim Huhn identifiziert. Diese wurden durch PCR Analyse auf einem Klon einer Hühner-BAC-Bibliothek nachgewiesen. Dies bedeutet, dass alle CHIR beim Huhn auf einem relativ kurzen Abschnitt auf dem Chromosom lokalisiert sind und ist ein Hinweis dafür, dass sie Mitglieder einer Multigenfamilie sind. Dies entspricht der Organisation der Ig-like Rezeptoren beim Säuger [1]. Außerdem wurden damit die durch Southern Blot Analyse gewonnenen Daten von Dennis et al. beim Huhn bestätigt [46].

Die sieben identifizierten Rezeptoren wurden drei verschiedene Rezeptortypen zugeordnet: die potenziell inhibitorischen CHIR-B, die potenziell aktivierenden CHIR-A und die potenziell inhibitorischen und aktivierenden CHIR-AB, die beim Huhn bisher noch nicht beschrieben wurden. Nachfolgend werden diese drei Rezeptortypen detailliert besprochen.

6.2 Potenziell inhibitorische Rezeptoren CHIR-B

6.2.1 Analyse der DNA- und AS-Sequenz

Die drei neu identifizierten inhibitorischen Rezeptoren CHIR-B2, -B3 und -B4 entsprachen in ihrem Aufbau dem publizierten CHIR-B [46], nun CHIR-B1 genannt, und bestanden als Mitglieder der Ig-Superfamilie aus zwei Ig-Domänen vom C2 Typ, einem ungeladenen transmembranen Bereich und einem langen zytoplasmatischen Anteil mit zwei ITIMs (siehe Abb. 5-8, S.73). CHIR-B2, -B3 und -B4 unterschieden sich von CHIR-B1, der in etwa die gleiche AS-Anzahl besaß, in 58 % der AS-Sequenz. Bei CHIR-B2 fiel auf, dass er zwischen der ersten und der zweiten Ig-Domäne zehn AS zusätzlich besaß (siehe Abb. 5-5, S.71). Die strukturell wichtigen AS, wie die Cysteine, die für die Bildung der Ig-Domänen verwendet wurden [71] und die AS-Sequenz der ITIMs [4] waren jedoch hochkonserviert und wiesen bei allen vier Vertretern keine großen Unterschiede auf.

6.2.2 Eingehende Charakterisierung von CHIR-B2

6.2.2.1 Genomische Organisation

Die Analyse der Anzahl und Anordnung der Exons und Introns ergab bei CHIR-B2, dass die ersten beiden Exons für das Signalpeptid kodierten und dann zwei Exons mit je einer Ig-Domäne folgten. Auf Exon 5 befand sich der transmembrane Bereich und Exon 6 und 7 kodierten für den zytoplasmatischen Bereich, wobei beide ITIMs auf dem letzten Exon lagen (siehe Abb. 5-9, S.74). Die Basenpaarsequenzen der Exon/Intronübergänge folgten der gt-ag Regel. Alle extrazytoplasmatischen und transmembranen Exons befanden sich in Phase 1, alle zytoplasmatischen in Phase 0 (siehe Tab. 5-2, S.77).

Ein Vergleich dieser genomischen Organisation mit anderen aus der Literatur zeigte, dass die Aufteilung des Signalpeptids auf zwei Exons typisch für alle Ig-like Rezeptoren beim Säuger ist. Außerdem entsprechen auch die hochkonservierten Exon/Intronübergänge der Situation bei Ig-like Rezeptoren des Säugers. Dass jede Ig-Domäne auf einem separaten Exon kodiert und dass diese in Phase 1 sind, ist typisch für alle Mitglieder der Ig-Superfamilie [21]. Die genomische Organisation des transmembranen Bereichs entspricht exakt der von KIR3DL3. Dieser bildet aber unter den KIR eine Ausnahme, da er zwischen der membranproximalen Ig-Domäne und dem transmembranen Bereich kein zusätzliches Exon für das Verbindungsstück besitzt, wie alle anderen KIR [72]. Die Exon/Intronstruktur des zytoplasmatischen Bereichs gleicht der genomischen Organisation dieses Bereichs bei allen KIR des Menschen [18].

6.2.2.2 Biochemische Analyse

Bei CHIR-B2 handelt es sich um ein glykosiliertes 46 kDa großes Protein, das zum Teil als Monomer und zum Teil als Dimer exprimiert wird (siehe Abb. 5-20, S.86 und Abb. 5-21, S.87).

6.2.2.3 Gewebeverteilung

Zum spezifischen Nachweis von mRNA Transkripten von CHIR-B2, wurde zum einen RT-PCR, zum anderen Northern Blot Analyse durchgeführt. Bei der RT-PCR wurde CHIR-B2 in Bursa, Milz, PBL, iIEL und HD11 detektiert (siehe Abb. 5-15, S.80). Der Northern Blot wies zusätzlich Transkripte in mRNA von NK-Zellen, BM-2, 2D8, RP-9, UG-9 und 855-23 nach (siehe Abb. 5-14, S. 79). Ein Problem bei dieser Technik könnte gewesen sein, dass es sich

bei CHIR um Rezeptoren einer Multigenfamilie handelt. Es wäre also durchaus möglich, dass bei der Hybridisierung der CHIR-B2-spezifischen Sonde mit der mRNA der einzelnen Zellarten auch eine Bindung mit einem zu CHIR-B2 sehr ähnlichen Rezeptor, der aber auf anderen Zellen als CHIR-B2 exprimiert wird, nachgewiesen werden konnte. Dadurch sind möglicherweise falschpositive Banden entstanden, die sehr vorsichtig interpretiert werden müssen.

Zur weiteren Analyse der Gewebeverteilung wurde ein spezifischer mAk gegen CHIR-B2 hergestellt, um die Proteinexpression auf Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu detektieren. Dabei wurde gezeigt, dass CHIR-B2 vor allem auf B-Zellen exprimiert ist (siehe Abb. 5-18, S. 84). Außerdem wurden 4 % der CD3⁺ Zellen mit Anti-CHIR-B2 mAk angefärbt, die aber nicht näher charakterisiert werden konnten. Da sich bei mehreren Versuchen unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der niederfrequenten CD3⁺ CHIR-B2⁺-Population ergaben, müssen diese CD3⁺ CHIR-B2⁺-Zellen zukünftig noch näher charakterisiert werden.

Vergleicht man die Ergebnisse aus RT-PCR und Northern Blot Analyse mit denen der Durchflusszytometrie, sind große Unterschiede in der Gewebeverteilung von CHIR-B2 zu erkennen. Dies lässt schlussfolgern, dass die Bestimmung des Expressionsmusters eines Mitglieds dieser Rezeptorfamilie nur durch Herstellung eines spezifischen mAk in eindeutiger Weise möglich ist. Der Nachweis von spezifischer mRNA ist nicht unbedingt zwingend für eine Expression dieses Proteins in der Zelle.

Die durch die Durchflusszytometrie dargestellte konstitutive Expression von CHIR-B2 auf Bursa und peripheren B-Zellen könnte darauf hinweisen, dass die Funktion des Rezeptors in vivo nicht durch die selektive Expression von diesem auf der Zelloberfläche reguliert wird, sondern durch die selektive Expression des für CHIRB2 spezifischen (noch unbekannt)en Liganden.

Beim Säuger gibt es keinen Ig-like Rezeptor, der ausschließlich auf B-Zellen exprimiert ist. Beim Mensch wird der inhibitorische Rezeptor ILT2 [27], bei der Maus werden alle PIR-A und PIR-B auf B-Zellen exprimiert [31]. Die genannten Rezeptoren sind aber zusätzlich dazu noch auf einer Vielzahl von myeloiden Zellen exprimiert.

6.2.2.4 Signaltransduktion

Für CHIR-B2 wurde gezeigt, dass die ITIMs im zytoplasmatischen Bereich zur Signaltransduktion fähig sind, da sie phosphoryliert werden konnten und die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 rekrutierten (siehe Abb. 5-23, S.89). Diese beiden Phosphatasen

werden auch bei dem in der Maus vorkommenden PIR-B [30] und bei den NK-Zell-spezifischen KIR [17] beim Mensch rekrutiert. Die ILT des Menschen rekrutieren nur SHP-1 [73]. Bei genauer Betrachtung des Western Blots fällt auf, dass SHP-2 bereits rekrutiert wurde bevor die Zellen mit Pervanadat behandelt wurden. Diese konstitutive Bindung von SHP-2 wurde bis jetzt nur bei den NK-Zell-spezifischen KIR nachgewiesen [17].

6.2.2.5 Inhibitorische Wirkungsweise

Als Beweis für die hemmende Wirkungsweise des inhibitorischen Rezeptors auf Zellen, wurde die Wachstumshemmung einer Hühner-B-Zelllinie gezeigt. Diese wurde spezifisch durch Kreuzvernetzung von CHIR-B2 auf der Zelloberfläche von stabil transfizierten Zellen ausgelöst (siehe Abb. 5-24, S.90). Die Hemmung der Proliferation ist in B-Zellen ein ITIM abhängiger Vorgang [4] und wurde deshalb als Beweis für die inhibitorische Wirkungsweise genutzt.

Weitere Experimente für einen Nachweis der inhibitorischen Wirkung auf Zellen, wie z. B. die Inhibition von FcεR-induzierter Serotoninfreisetzung aus Mastzellen [25] wurden daher nicht durchgeführt.

6.3 Potenziell aktivierende Rezeptoren CHIR-A

6.3.1 Analyse der DNA- und AS-Sequenz

Die zwei neu identifizierten aktivierenden Vertreter CHIR-A2 und -A3 unterschieden sich in 54 % der AS-Sequenz vom publizierten CHIR-A [46], nun CHIR-A1 genannt (siehe Abb. 5-6, S.72). Der strukturelle Aufbau dieser, mit zwei extrazellulären Ig-Domänen vom C2 Typ, einer positiv geladenen AS im transmembranen Bereich und einem kurzen zyttoplasmatischen Anteil, entsprach grundsätzlich CHIR-A1, bis auf den großen Unterschied, dass es sich bei der positiv geladenen AS im transmembranen Bereich um ein im vorderen Bereich lokalisiertes Arginin handelt und nicht um ein am Ende gelegene Histidin, wie bei CHIR-A1. Dieses, in der zweiten α -helikalen Umdrehung der transmembranen Region gelegene Arginin, findet sich auch bei aktivierenden Ig-like Rezeptoren des Säugers, nämlich dem humanem ILT [27] und dem murinem PIR [31]. Diese assoziieren mit dem Adaptormolekül FcεRI γ , um einen funktionellen aktivierenden Rezeptor zu bilden [26, 74]. Es liegt nahe, dass es sich bei CHIR-A2 und -A3 ebenfalls um FcεRI γ handeln könnte, da Art und Lokalisation der positiven Ladung der Situation beim Säuger entsprechen. Auf die

weitergehenden Untersuchungen in Bezug auf das assoziierte Adaptormolekül von CHIR-A2 wird in Abschnitt 6.6.1, S.101, näher eingegangen.

Die bei CHIR-A1 vorkommende positiv geladene AS Histidin scheint exklusiv beim Huhn vorzukommen. Möglich wäre aber auch, dass dieses Histidin nur zufällig an dieser Stelle liegt und es sich eigentlich um einen inhibitorischen Rezeptor handelt, der aufgrund eines PCR-Artefakts oder eines Sequenzierfehlers nicht als solcher erkannt wurde. Ein Hinweis hierfür könnte auch sein, dass bei der PCR mit CHIR-A1 spezifischen Primern auch ein inhibitorischer Rezeptor amplifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 5.1.5, S.68).

6.3.2 Eingehende Charakterisierung von CHIR-A2

6.3.2.1 Genomische Organisation

CHIR-A2 bestand aus insgesamt 5 Exons, die in Struktur und Phase den Exons von extrazytoplasmatischen und transmembranen Bereich von CHIR-B2 entsprachen (siehe Abb. 5-10, S.75). Es wurden keine Exons für den zytoplasmatischen Bereich gefunden. Bei der Analyse der genomischen Organisation von CHIR-A2 konnte aber nicht beurteilt werden, ob sie der Struktur der aktivierenden ILT oder KIR entspricht. Aktivierende KIR entstehen nur durch ein, durch eine Punktmutation eingeführtes, vorzeitiges Stopp Codon; die Exons für den langen zytoplasmatischen Teil sind in der genomischen Sequenz immer noch vorhanden [1]. Bei den aktivierenden ILT sind in der genomischen Sequenz keine Exons für einen langen zytoplasmatischen Bereich vorhanden [18]. Eine Aussage darüber ist deshalb nicht möglich, da die genomische Sequenz von CHIR-A2 durch eine PCR mit spezifischen CHIR-A2 Primern identifiziert wurde, die CHIR-A2 nur bis zum Stopp Codon darstellen konnten. Eine genauere Analyse ist nur durch Sequenzierung des genomischen Locus möglich.

6.3.2.2 Biochemische Analyse

CHIR-A2 hat ein M_R von ca. 42 kDa und ist glykosiliert. Es kann keine Aussage gemacht werden, ob er als Monomer oder Dimer exprimiert wird, da CHIR-A2 unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht darstellbar war (siehe Abb. 5-22, S.88).

6.3.2.3 Gewebeverteilung

Durch RT-PCR und Northern Blot Analyse wurde dargestellt, dass spezifische Transkripte in Bursa, PBL, NK-Zellen, BM-2, HD11, 2D8 und RP-9 vorhanden waren. Im Northern Blot

wurden im Gegensatz zur RT-PCR zusätzlich Transkripte in Milz, iIEL und der T-Zelllinie 855-23 detektiert. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse sollte sehr vorsichtig diskutiert werden (vgl. dazu Abschnitt 6.2, S.92). Für die bessere Charakterisierung der Gewebeexpression sollte daher noch ein mAk hergestellt werden.

6.4 Potenziell inhibitorische und aktivierende Rezeptoren CHIR-AB

6.4.1 Analyse der DNA- und AS-Sequenz

CHIR-AB1 und -AB2 besitzen im Gegensatz zu den beiden anderen Rezeptortypen nur eine extrazelluläre Ig-Domäne vom C2 Typ, eine positiv geladene AS im transmembranen Bereich und einem langen zytoplasmatischen Abschnitt mit einer N-terminalen, wahrscheinlich mutierten ITIM-ähnlichen Sequenz (LTYAEM) und einem C-terminalen ITIM (siehe Abb. 5-7, S.72). Bei der positiv geladenen AS handelt es sich bei CHIR-AB1 um Arginin und bei CHIR-AB2 um Lysin. Die Lokalisation der beiden ist gleich und entspricht in etwa derselben Position, wie bei den neu identifizierten aktivierenden Rezeptoren CHIR-A2 und -3.

6.4.2 KIR2DL4 - einziger CHIR-AB-ähnlicher Rezeptor

Der einzige bisher in der Literatur beschriebene Ig-like Rezeptor, der auch eine positiv geladene AS (Arginin) im transmembranen Bereich und einen langen zytoplasmatischen Bereich mit einem ITIM besitzt ist KIR2DL4. Beim Menschen handelt es sich hier zwar um ein N-terminales ITIM und nicht um ein C-terminales wie beim Huhn, bei anderen Primaten konnten aber auch KIR2DL4 mit C-terminalem ITIM identifiziert werden [23]. Auffällig ist, dass das jeweils andere ITIM beim Mensch und bei anderen Primaten ebenso wie hier beim Huhn in mutierter Form vorliegt. Bei KIR2DL4 handelt es sich um einen bei Mensch und anderen Primaten hochkonservierten Rezeptor, der auf allen NK-Zellen exprimiert ist. Es wurden sowohl seine inhibitorische, als auch seine aktivierende Funktion beschrieben. Nach Stimulation von KIR2DL4 kommt es einerseits zur Hemmung der natürlichen NK-Zell-Zytotoxizität [15], andererseits zur Aktivierung der IFN γ Synthese [14]. Interessanterweise bindet KIR2DL4 ein nicht-klassisches MHC I Molekül, das als HLA-G bezeichnet wird und vor allem auf fetalen Trophoblastenzellen exprimiert wird [12]. Für KIR2DL4 wird daher eine doppelte Funktion während der Gravidität postuliert. Einerseits hemmt die HLA-G:KIR2DL4 Interaktion die natürliche NK-Zell-Zytotoxizität und dient dadurch dem Schutz des allogenen Embryos [75], andererseits wird die IFN γ -Synthese aktiviert [16], die

als wichtiger Faktor bei der Vaskularisation der Plazenta diskutiert wird [76]. Allerdings wurde mittlerweile eine Frau beschrieben, die kein KIR2DL4 besitzt und vollkommen normale Graviditäten hatte [77].

Diese hypothetische Funktion von KIR2DL4 während der Gravidität ist aufgrund der Entwicklung des Hühnerembryos im Ei nicht auf das Huhn zu übertragen. Für weitere Spekulationen über eine mögliche Funktion von CHIR-AB sollten aber zuerst der Ligand und die tatsächlich detektierbare Wirkungsweise von CHIR-AB geklärt werden. Das Beispiel belegt allerdings, dass sich eine sowohl hemmende, als auch aktivierende Funktion eines Rezeptors nicht grundsätzlich gegenseitig ausschließen.

6.4.3 Phylogenetische Bedeutung von CHIR-AB

Die Bedeutung von CHIR-AB mit vielen Merkmalen von KIR2DL4 erlaubt auch Spekulationen zur Phylogenese. CHIR-AB könnte ein mögliches Vorläufermolekül von KIR2DL4 sein. Möglich wäre auch, dass zahlreiche Duplikationen und Mutationen eines CHIR-AB ähnlichen Vorläufermoleküls schließlich beim Säuger zur Entstehung aller im LRC kodierenden Rezeptoren geführt haben könnte. Ein Hinweis hierfür ist auch das Vorhandensein zweier verschiedener positiver AS im transmembranen Bereich. Bei CHIR-AB1 handelt es sich um Arginin, das sowohl in humanen ILT und murinen PIR als auch in humanem KIR2DL4 und bovinen KIR vorkommt [9, 27, 31, 39]. Bei CHIR-AB2 ist es Lysin, das ausschließlich bei klassischen KIR von Mensch und anderen Primaten vorkommt [9]. Auch Storset et al. sind der Ansicht, dass es grundsätzlich vorstellbar ist, dass die hochpolymorphe Gruppe der KIR aus einem Gen hervorging, welches sowohl die aktivierenden als auch die inhibitorischen Eigenschaften in sich vereint. Durch Einführung von Punktmutationen kommt es nicht zu einer Expression des zytoplasmatischen Abschnitts und somit zur Entstehung eines rein aktivierenden Rezeptors [39].

6.4.4 Eingehende Charakterisierung von CHIR-AB1

6.4.4.1 Genomische Organisation

Bei CHIR-AB1 fällt auf, dass die einzige vorhandene Ig-Domäne auf genomischer Ebene der membrandistalen Ig-Domäne von CHIR-A2 und -B2 entspricht. Die membranproximale Ig-Domäne fehlt also auf cDNA Ebene, aber in dem sehr langen Intron zwischen der exprimier-

ten Ig-Domäne und dem transmembranen Bereich, lässt sich ein Pseudoexon, das für eine zweite Ig-Domäne kodiert, erkennen (siehe Abb. 5-11, S.75).

Beim Säuger kommen bei den Typ II KIR Genen (KIR2DL/S1-3) auch Pseudoexons für Ig-Domänen vor [19]. Jedoch handelt es sich dabei um eine zwischen Signalpeptid und membrandistaler Ig-Domäne als Pseudoexon vorhandene Ig-Domäne und nicht wie hier um ein Pseudoexon zwischen membranproximaler Ig-Domäne und transmembraner Region.

6.4.4.2 Biochemische Analyse

Die biochemische Analyse von CHIR-AB1 ist vorsichtig zu interpretieren. Unter reduzierenden Bedingungen konnte ein sehr prominentes Protein mit einer Größe von 46 kDa und ein weiteres Protein von 40 kDa dargestellt werden (siehe Abb. 5-22, S.88). Es kann keine Aussage gemacht werden, ob dieser Rezeptor als Monomer oder Dimer exprimiert wird, da CHIR-AB1 unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht darstellbar war. Nach Deglykosilierung hatte CHIR-AB1 ein M_R von ca. 35 kDa, was aber wesentlich größer war, als das theoretisch errechnete M_R von 22 kDa.

Die Gründe für diesen Unterschied könnten andere Formen der posttranslationalen Modifikation sein. Vor allem eine konstitutive intrazelluläre Phosphorylierung könnte das M_R entscheidend beeinflussen, da bekannt ist, dass Phosphorylierungen die Migration im SDS-Gel beeinflussen [78]. Das Protein mit einem M_R von 46 kDa könnte also die phosphorylierte Form darstellen, das Protein mit 40 kDa könnte dem glykosylierten, aber nicht phosphorylierten Rezeptor entsprechen. Zur weiteren Abklärung müsste das immunpräzipitierte Protein vor der Auftrennung in der SDS-PAGE mit einer Phosphatase verdaut werden.

6.4.4.3 Gewebeverteilung

Beim Nachweis spezifischer mRNA Transkripte von CHIR-AB1 wurden diese durch RT-PCR und Northern Blot in Bursa, Milz, PBL, iIEL, NK-Zellen, BM-2, HD11, 2D8, RP-9, UG-9 und 855-23 detektiert.

Bei der Analyse der Oberflächenexpression durch einen spezifischen Anti-CHIR-AB1 Antikörper wurde gezeigt, dass CHIR-AB1 auf B-Zellen, auf der B-Zelllinie DT-40, auf unstimulierten und stimulierten PBL-Makrophagen, auf Knochenmarksmakrophagen, auf den Makrophagenzelllinien HD11 und BM-2 und auf NK-Zellen im Darm exprimiert ist. Außerdem wurden ca. 16 % aller $CD3^+$ Zellen mit dem spezifischen Anti-CHIR-AB1 Antikörper angefärbt. Diese $CD3^+ CHIR-AB1^+$ Subpopulation muss noch weiter charakterisiert

werden. CHIR-AB1 ist also auf verschiedensten myeloiden und lymphoiden Zellen exprimiert, wie es für die Familie der ILT und PIR üblich ist [27, 31].

Die Expression auf einer Vielzahl von myeloiden und lymphoiden Zellen würde auch nicht der in Abschnitt 6.4.3, S.98 dargestellten Theorie widersprechen, dass CHIR-AB ähnliche Vorläufermoleküle zur Entwicklung des gesamten Rezeptorrepertoires im LRC geführt haben könnten. Die Spezialisierung von bestimmten Rezeptoren (KIR) auf bestimmte Zellarten (NK-Zellen) könnte auch erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Evolution der Primaten stattgefunden haben. Die beim Huhn immer noch vorkommenden Vorläufermoleküle waren dagegen auf verschiedensten Zellen exprimiert.

6.5 CHIR – Homolog zu KIR oder ILT?

6.5.1 Zuordnung aufgrund struktureller Gegebenheiten

Aufgrund der großen phylogenetischen Distanz zwischen Vogel und Säugetier ist eine klare Zuordnung aufgrund des strukturellen Aufbaus und der AS-Homologie schwierig. Auffällig ist allerdings, dass der einzige in der Literatur beschriebene Rezeptor mit einem ähnlichen Aufbau wie CHIR-AB ein Vertreter der KIR, nämlich KIR2DL4 ist, wobei dieser aber statt einer Ig-Domäne (CHIR-AB) zwei Ig-Domänen besitzt.

Grundsätzlich kann bei Mitgliedern der Ig-Superfamilie die Anzahl und Anordnung der Ig-Domänen aufgrund des sog. Exon-Shufflings sehr unterschiedlich sein. Vergleicht man z. B. die PIR der Maus mit den orthologen ILT beim Mensch, sind bei den PIR sechs extrazytoplasmatische Ig-Domänen vorhanden, während bei den ILT nur zwei bis vier Ig-Domänen vorkommen. Eine Zuordnung aufgrund der Ig-Domänenanzahl, z. B. dass KIR2D und CHIR jeweils zwei besitzen, ist also nicht möglich.

6.5.2 Zuordnung aufgrund der genomischen Organisation

Der Aufbau von CHIR-B2 und CHIR-AB1 gleicht grundsätzlich dem von KIR3DL3, bis auf die Tatsache, dass CHIR-AB1 ein Pseudoexon für die membranproximale Ig-Domäne besitzt. Auch bei CHIR-A2 sind die extrazytoplasmatischen und transmembranen Exons wie bei KIR3DL3. Ob die genomische Organisation des zytoplasmatischen Bereichs aber der von KIR oder ILT entspricht konnte nicht dargestellt werden.

6.5.3 Zuordnung aufgrund der Gewebeexpression

Die humanen ILT und ihre murinen Orthologe PIR sind auf einer Vielzahl von myeloiden und lymphoiden Zellen exprimiert. Die humanen KIR werden ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert. Die hier identifizierten CHIR wurden auf verschiedenen lymphoiden und myeloiden Zellen detektiert. Dies spricht grundsätzlich gegen eine Zuordnung zu den KIR. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass CHIR-AB1 auch auf NK-Zellen exprimiert ist. Möglich wäre also auch, dass beim Huhn keine NK-Zell-spezifische Rezeptorgruppe vorkommt, sondern dass die CHIR regulatorische Aufgaben auf allen lymphoiden und myeloiden Zellen übernehmen.

Zusammenfassend kann also keine konkrete Aussage über eine Zuordnung der CHIR beim Huhn gemacht werden, da einige Daten für die Zuordnung als KIR-Homologe, andere wiederum für ILT-Homologe sprechen. Möglich ist auch, dass die CHIR beim Huhn funktionelle Eigenschaften beider Rezeptorgruppen besitzen und Vorläufermoleküle für Vertreter beider Gruppen darstellen. Weiterführende Untersuchungen über die Funktion dieser Rezeptoren und eine Analyse des genomischen Locus könnten hierüber Aufschluss geben.

6.6 Weiterführende Untersuchungen

6.6.1 Nachweis des Adaptormoleküls von CHIR-A2

Um das Adaptormolekül des aktivierenden Rezeptors genauer zu charakterisieren, sollen folgende Experimente durchgeführt werden. Zunächst soll geklärt werden, ob eines der beim Säuger assoziierten Adaptormoleküle (DAP12, Fc ϵ RI γ , und CD3 ζ) beim Huhn verwendet wird. Fc ϵ RI γ , und CD3 ζ konnten beim Huhn bereits identifiziert werden. DAP-12 müsste noch durch EST-Datenbankanalyse kloniert werden. Möglicherweise würde aber auch, wegen der hohen Homologien derartiger Ketten zwischen Säuger und Vogel, das humane DAP-12 funktionieren.

Die Analyse der Assoziation von CHIR-A mit dem jeweiligen Adaptormolekül kann dann durch Kotransfektionsexperimente mit nachfolgender biochemischer Analyse durchgeführt werden.

Außerdem könnte durch Pervandantbehandlung dieser Zellen eine Funktionalität des aktivierenden Komplexes nachgewiesen werden, wenn phosphorylierte Tyrosinreste detektiert

werden können und wenn die Signaltransduktionsmoleküle Syk bzw. ZAP-70 nachgewiesen werden können [5].

6.6.2 Identifizierung der Liganden von CHIR-B2, -A2 und -AB1

Die löslichen huIg-Konstrukte könnten für die Identifizierung der Liganden von CHIR-B2, -A2 und -AB1 von großem Nutzen sein. Dass diese löslichen Konstrukte dem physiologisch vorkommenden extrazytoplasmatischen Bereich des jeweiligen Rezeptors entsprechen, konnte bei CHIR-B2 und CHIR-AB1 durch eine Bindung des spezifischen mAk an das huIg-Konstrukt im ELISA gezeigt werden (siehe Abb. 5-25, S.91). Für CHIR-A2-huIg ist dies ebenfalls anzunehmen, da es auf die gleiche Weise hergestellt wurde. Ein Beweis sollte aber nach Herstellung eines spezifischen mAk noch erbracht werden.

Eine Bindung zwischen dem löslichen Rezeptor und seinem Liganden auf der Zelle könnte durch Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Hat man diese Zellen identifiziert, könnte man versuchen, den Liganden durch Präzipitation mit dem löslichen Rezeptor aus dem Zelllysate aufzureinigen und das Protein genauer zu analysieren.

Da es sich bei den meisten Liganden von KIR und ILT um MHC I Moleküle handelt, könnte man auch versuchen, durch die Bindung von verschiedensten löslichen MHC I Tetrameren an Zellen, die den jeweiligen Rezeptor exprimieren, das spezifische MHC I Molekül nachzuweisen.

6.6.3 Weiterverwendung eines CHIR-spezifischen BAC Klons

Der identifizierte BAC Klon wird momentan in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Tierzucht der TU München für weitere chromosomale Analysen verwendet. Dabei wird durch Hybridisierung des BAC Klons mit Hühnerchromosomen (sog. Fluoreszenzmarkierte-in-Situ-Hybridisierung) versucht, die Lokalisation dieser Gene auf ein bestimmtes Chromosom festzulegen.

Außerdem könnte die Organisation des LRC-Homologs beim Huhn durch Sequenzierung des BAC Klons identifiziert werden. Eine Aussage darüber wird aber auch nach Abschluss des Hühner-Genom Projektes Ende 2004 möglich sein.

7 Zusammenfassung

Einige vor kurzem identifizierte Rezeptorfamilien auf myeloiden und lymphoiden Zellen bei Mensch und Maus weisen sowohl inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren auf, die wichtige Funktionen bei der Regulation des Immunsystems haben. Nachdem nur wenig über vergleichbare Familien bei anderen Vertebraten bekannt war, wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt sieben neue Vertreter dieser Rezeptorfamilie beim Huhn eingehend charakterisiert.

Alle identifizierten Rezeptoren wurden mit Hilfe von PCR-Analyse auf einem Klon einer Hühner-BAC-Bibliothek lokalisiert; das bedeutet, sie liegen eng benachbart auf einem Chromosomenabschnitt. Diese Lokalisation und die hohe AS-Homologie weisen darauf hin, dass es sich um verschiedene Rezeptoren einer Multigenfamilie handelt.

Die Analyse der genomischen Organisation dieser Rezeptoren zeigte, dass das Signalpeptid auf zwei Exons verteilt war, jede Ig-Domäne durch ein separates Exon kodiert wurde, der transmembrane Bereich auf einem Exon lag und der lange zytoplasmatische Bereich (bei den inhibitorischen Rezeptortypen) durch zwei Exons kodiert wurden, wobei beide ITIMs auf dem letzten Exon lagen. Außerdem folgten die Exon/Intronübergänge der gt-ag Regel und die Phasen der Exons waren hochkonserviert. Die genomische Organisation hatte also eine homologe Struktur zu vergleichbaren Ig-like Rezeptoren beim Säuger.

Die sieben neu identifizierten Chicken Ig-like Rezeptoren (CHIR) wurden drei verschiedenen Rezeptortypen zugeordnet.

Die aktivierenden CHIR-A besaßen zwei extrazytoplasmatische Ig-Domänen und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil, hatten aber im transmembranen Bereich eine positiv geladene AS, die mit einem ITAM-haltigen Adaptormolekül assoziieren könnte. CHIR-A2 hatte ein relatives Molekulargewicht (M_R) von ca. 42 kDa und wurde in mRNA von Bursa, PBL, NK-Zellen und verschiedenen Makrophagen- und B-Zelllinien detektiert.

Die inhibitorischen CHIR-B besaßen zwei Ig-Domänen und einen langen zytoplasmatischen Bereich mit zwei ITIMs. CHIR-B2 hatte ein M_R von ca. 46 kDa und wurde durch einen neu hergestellten, spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) vor allem auf B-Zellen detektiert. Die ITIMs im zytoplasmatischen Anteil wurden nach Pervanadatbehandlung phosphoryliert und rekrutierten die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und -2. Die Stimulation von CHIR-B2 hatte eine hemmende Wirkung auf das Wachstum einer B-Zelllinie.

Die potenziell inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren CHIR-AB besaßen eine Ig-Domäne, einen langen zytoplasmatischen Anteil mit einem ITIM und eine positiv geladene AS im transmembranen Bereich, die mit einem ITAM-haltigen Adaptormolekül assoziieren könnte. Der einzige in der Literatur beschriebene Rezeptor, mit einem ähnlichen Aufbau, ist der auf allen NK-Zellen von Mensch und anderen Primaten exprimierte, hochkonservierte KIR2DL4 mit aktivierender und inhibitorischer Wirkung. CHIR-AB1, der ein M_R von ca. 40 kDa besitzt, wurde durch einen spezifischen mAk auf B-Zellen, auf der B-Zelllinie DT-40, auf Makrophagen, auf verschiedenen Makrophagenzelllinien und auf NK-Zellen im Darm nachgewiesen.

8 Summary

Title: Molecular and functional Characterization of new Chicken Ig-like Receptors.

Some recently described receptor families on myeloid and lymphoid cells in man and mouse have both inhibitory and activating receptors with important functions in the regulation of the immune system. Due to the lack of information regarding these receptors in other vertebrates, in the present thesis seven new members of this receptor family were identified in the chicken.

All receptors identified were located on one single clone of a chicken BAC library, which indicates that they are tightly clustered on the chromosome. This localisation and the high amino acid homology suggests, that they belong to a multigene-family.

Analysis of the genomic organisation showed, that the signalpeptide was split into two exons, each Ig-domain and the transmembrane region were encoded by separate exons and the long cytoplasmic tail (in case of inhibitory receptors) was encoded by two exons, the last exon containing the ITIMs. The exon/intron boundaries conformed to the gt-ag rule and the exon phases were highly conserved. In conclusion, the genomic organisation showed conserved features of mammalian Ig-like receptor genes.

The novel identified CHIR were grouped into three different types of receptors.

The activating CHIR-A had two extracytoplasmic Ig-domains and a short cytoplasmic tail, but a positively charged amino acid in the transmembrane region, which could associate to an ITAM-containing adaptor molecule. CHIR-A2 had a relative molecular weight of ~ 42 kDa and was detected in the mRNA of bursa, spleen, PBL, NK-cells and different macrophage- and B-cell lines.

The inhibitory CHIR-B consisted of two Ig-domains and a long cytoplasmic tail with two ITIMs in it. CHIR-B2 had a relative molecular weight of ~ 46 kDa and was only detectable on B-cells by a newly produced specific monoclonal antibody (mAb). Upon Pervanadate treatment the ITIMs in the cytoplasmic tail were phosphorylated and recruited the protein-tyrosine-phosphatases SHP-1 and -2. Additionally ligation of CHIR-B2 had an inhibitory effect on the cell proliferation of a B-cell line.

The potentially inhibitory and activating CHIR-AB had one Ig-domain, a long cytoplasmic tail with one ITIM in it and a positively charged amino acid in the transmembrane region, which could associate with an ITAM-containing adaptor molecule. The only CHIR-AB homologue in the literature is KIR2DL4, that represents a highly conserved

Ig-like Receptor expressed on all primate NK-cells with both activating and inhibitory function.

CHIR-AB1 had a molecular weight of ~ 40 kDa and its expression on B-cells, on the B-cell line DT-40, on primary macrophages, different macrophage cell lines and on NK-cells in the gut was detected by a specific mAb.

9 Literaturverzeichnis

1. Barten, R., et al., *Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors*. Trends in Immunology, 2001. **22**: p. 52-57.
2. Vilches, C., et al., *KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains*. Journal of Immunology, 2000. **164**: p. 5797-5804.
3. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. Annual Review in Immunology, 1988. **6**: p. 381-405.
4. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**: p. 84-89.
5. Campbell, K.S. and M. Colonna, *Human natural killer cell receptors and signal transduction*. International Reviews of Immunology, 2001. **20**: p. 333-370.
6. Gergely, J., I. Pecht, and G. Sarmay, *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells*. Immunology Letters, 1999. **68**: p. 3-15.
7. Wilson, M.J., et al., *Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2000. **97**: p. 4778-4783.
8. Wende, H., et al., *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4*. Mammalian Genome, 1999. **10**: p. 154-160.
9. Martin, A.M., et al., *Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men*. Trends in Immunology, 2002. **23**: p. 81-88.
10. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunology Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
11. Borrego, F., et al., *Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells*. Mol Immunol, 2002. **38**(9): p. 637-60.
12. Rajagopalan, S. and E.O. Long, *A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells*. J. of Experimental Medicine, 1999. **189**(7): p. 1093-100.
13. Colucci, F., J.P. Di Santo, and P.J. Leibson, *Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons?* Nature Immunology, 2002. **3**: p. 807-813.
14. Rajagopalan, S., J. Fu, and E.O. Long, *Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells*. Journal of Immunology, 2001. **167**: p. 1877-1881.

15. Yusa, S., T.L. Catina, and K.S. Campbell, *SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells*. Journal of Immunology, 2002. **168**: p. 5047-5057.
16. McQueen, K.L. and P. Parham, *Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells*. Current Opinion in Immunology, 2002. **14**: p. 615-621.
17. Yusa, S. and K.S. Campbell, *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells*. Journal of Immunology, 2003. **170**: p. 4539-4547.
18. Trowsdale, J., et al., *The genomic context of natural killer receptor extended gene families*. Immunological Reviews, 2001. **181**: p. 20-38.
19. Vilches, C., M.J. Pando, and P. Parham, *Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain*. Immunogenetics, 2000. **51**: p. 639-646.
20. Wilson, M.J., M. Torkar, and J. Trowsdale, *Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene*. Tissue Antigens, 1997. **49**: p. 574-579.
21. Torkar, M., et al., *Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex*. European Journal of Immunology, 1998. **28**(12): p. 3959-67.
22. Martin, M.P., et al., *Cutting Edge: Expansion of the KIR locus by unequal crossing over*. Journal of Immunology, 2003. **171**: p. 2192-2195.
23. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annual Reviews of Immunology, 2002. **20**: p. 217-251.
24. Volz, A., et al., *Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex*. Immunological Reviews, 2001. **181**: p. 39-51.
25. Bellon, T., et al., *Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor*. Journal of Immunology, 2002. **168**: p. 3351-3359.
26. Nakajima, H., et al., *Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain*. Journal of Immunology, 1999. **162**: p. 5-8.
27. Colonna, M., H. Nakajima, and M. Cella, *A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells*. Seminars in Immunology, 2000. **12**: p. 121-127.
28. Colonna, M., et al., *A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells*. Journal of Leukocyte Biology, 1999. **66**: p. 375-381.

29. Torkar, M., et al., *Arrangement of the ILT gene cluster: a common null allele of the ILT6 gene results from a 6.7-kbp deletion*. European Journal of Immunology, 2000. **30**: p. 3655-3662.
30. Maeda, A., et al., *Requirement of SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 for paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B)-mediated inhibitory signal*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **187**: p. 1355-1360.
31. Takai, T. and M. Ono, *Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family*. Immunological Reviews, 2001. **181**: p. 215-222.
32. Ono, M., et al., *Stimulatory function of paired immunoglobulin-like receptor-A in mast cell line by associating with subunits common to Fc receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**: p. 30288-30296.
33. Meyaard, L., et al., *LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 283-90.
34. Meyaard, L., et al., *Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 functions as an inhibitory receptor on cytotoxic T cells*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5800-4.
35. Meyaard, L., et al., *The epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) is a ligand for the leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor (LAIR)*. Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**: p. 107-112.
36. Wines, B.D., et al., *Identification of residues in the first domain of human Fc alpha receptor essential for interaction with IgA*. Journal of Immunology, 1999. **162**: p. 2146-2153.
37. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**: p. 953-960.
38. Clemetson, J.M., et al., *The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc alpha R and the natural killer receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**: p. 29019-29024.
39. Storset, A.K., et al., *Natural killer cell receptors in cattle: a bovine killer cell immunoglobulin-like receptor multigene family contains members with divergent signaling motifs*. European Journal of Immunology, 2003. **33**: p. 980-990.
40. McQueen, K.L., et al., *Evolution of NK receptors: a single Ly49 and multiple KIR genes in the cow*. European Journal of Immunology, 2002. **32**: p. 810-817.
41. Yoder, J.A., et al., *Immune-type receptor genes in zebrafish share genetic and functional properties with genes encoded by the mammalian leukocyte receptor cluster*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2001. **98**: p. 6771-6776.
42. Hawke, N.A., et al., *Extraordinary variation in a diversified family of immune-type receptor genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2001. **98**: p. 13832-13837.

43. Yoder, J.A., et al., *Cloning novel immune-type inhibitory receptors from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. Immunogenetics, 2002. **54**: p. 662-670.
44. Strong, S.J., et al., *A novel multigene family encodes diversified variable regions*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1999. **96**: p. 15080-15085.
45. Litman, G.W., N.A. Hawke, and J.A. Yoder, *Novel immune-type receptor genes*. Immunological Reviews, 2001. **181**: p. 250-259.
46. Dennis, G., Jr., H. Kubagawa, and M.D. Cooper, *Paired Ig-like receptor homologs in birds and mammals share a common ancestor with mammalian Fc receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2000. **97**: p. 13245-13250.
47. Martin, A., et al., *Antigen-specific T cell proliferation following coccidia infection*. Poultry Science, 1993. **72**: p. 2084-2094.
48. Weining, K.C., et al., *Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma*. European Journal of Immunology, 1996. **26**: p. 2440-2447.
49. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Molecular Cell Biology, 1987. **7**: p. 379-387.
50. Shulman, M., C.D. Wilde, and G. Kohler, *A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies*. Nature, 1978. **276**: p. 269-270.
51. Puehler, F., et al., *A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon-gamma*. Journal of Immunological Methods, 2003. **274**: p. 229-232.
52. Beug, H., et al., *Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation*. Cell, 1979. **18**: p. 375-390.
53. Bading, H., C. Beutler, and K. Moelling, *Mapping of a small phosphopeptide at the carboxyterminus of the viral myb protein by monoclonal antibodies*. Oncogene, 1989. **4**: p. 33-38.
54. Nazerian, *An updated listing of avian cell lines and transplantable tumours*. Avian Pathology, 1991. **16**: p. 527-544.
55. Schat, K.A., et al., *Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus*. The Journal of Virology, 1991. **65**: p. 1408-1413.
56. Baba, T.W., B.P. Giroir, and E.H. Humphries, *Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes*. Virology, 1985. **144**: p. 139-151.
57. Lahti, J.M., et al., *Two distinct alpha beta T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor V beta gene segments*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1991. **88**: p. 10956-10960.
58. Beug, H., et al., *Erythroblast cell lines transformed by a temperature-sensitive mutant of avian erythroblastosis virus: a model system to study erythroid differentiation in vitro*. Journal of Cell Physiology Supplements, 1982. **1**: p. 195-207.

59. Chen, C.L., J.E. Lehmeyer, and M.D. Cooper, *Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes*. Journal of Immunology, 1982. **129**: p. 2580-2585.
60. Rothwell, C.J., L. Vervelde, and T.F. Davison, *Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996. **55**: p. 225-234.
61. Chen, C.L., et al., *Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens*. Journal of Experimental Medicine, 1986. **164**: p. 375-380.
62. Göbel, T.W., *NK- and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken*. In Preparation, 1999.
63. Deeg, C.A., *Entwicklung monoklonaler Antikörper zur Charakterisierung aviärer Makrophagen*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde, 1997.
64. Bjorck, L. and G. Kronvall, *Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent*. Journal of Immunology, 1984. **133**: p. 969-974.
65. Lisanti, N., *Biotinylation and Analysis of Membrane-Bound and Soluble Proteins*, in *Current Protocols in Immunology*, J.E. Coligan, Editor. 1994, John Wiley et Sons, Inc. p. 8.16.1-8.16.5.
66. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
67. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1979. **76**: p. 4350-4354.
68. Goitsuka, R., C.H. Chen, and M.D. Cooper, *B cells in the bursa of Fabricius express a novel C-type lectin gene*. Journal of Immunology, 1997. **159**: p. 3126-3132.
69. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**: p. 4673-4680.
70. Crooijmans, R.P., et al., *Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library*. Mammalian Genome, 2000. **11**: p. 360-363.
71. Kuma, K., N. Iwabe, and T. Miyata, *The immunoglobulin family*. Current Opinion in Structural Biology, 1991. **1**: p. 384-393.
72. Carrington, M. and P. Norman, *The KIR Gene Cluster*. 2003, www.ncbi.nlm.nih.gov/book/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf. p. 1-48.
73. Colonna, M., et al., *A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells*. Journal of Experimental Medicine, 1997. **186**: p. 1809-1818.

74. Maeda, A., M. Kurosaki, and T. Kurosaki, *Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A is involved in activating mast cells through its association with Fc receptor gamma chain*. *Journal of Experimental Medicine*, 1998. **188**: p. 991-995.
75. Ponte, M., et al., *Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1999. **96**: p. 5674-5679.
76. Ashkar, A.A. and B.A. Croy, *Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy*. *Seminars in Immunology*, 2001. **13**: p. 235-241.
77. Gomez-Lozano, N., et al., *Recognition of HLA-G by the NK cell receptor KIR2DL4 is not essential for human reproduction*. *European Journal of Immunology*, 2003. **33**: p. 639-644.
78. Göbel, T.W., C.H. Chen, and M.D. Cooper, *Expression of an avian CD6 candidate is restricted to $\alpha\beta$ T cells, splenic CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells and embryonic natural killer cells*. *European Journal of Immunology*, 1996. **26**(8): p. 1743-7.

Anhang: Bezugsquellen

A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend folgender Tabelle im Kapitel 4, Material und Methoden, integriert.

- 1 Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- 2 AppliChem, Darmstadt
- 3 Biochrom, Berlin
- 4 Biontex, München
- 5 Bio-Rad, München
- 6 Fenwal Laboratories, Deerfield, USA
- 7 Invitrogen, Karlsruhe
- 8 Macherey-Nagel, Düren
- 9 MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- 10 Merck, Darmstadt
- 11 MWG, Ebersberg
- 12 New England Biolabs, Frankfurt a. Main
- 13 Packard, Dreieich
- 14 Pierce, Rockford Illinois, USA
- 15 Qiagen, Hilden
- 16 Roche Diagnostics, Mannheim
- 17 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
- 18 Schleicher und Schuell, Dassel
- 19 Sigma, Deisenhofen
- 20 Stratagene, Amsterdam, NL
- 21 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
- 22 Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA
- 23 Upstate, Lake Placid, NY, USA
- 24 Whatman, Maidstone, GB

B Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Affinitätschromatograph	GradiFrac™ System mit Peristaltic Pump P-1, Monitor UV-1 und Recorder REC 102	Pharmacia Biotech, Freiburg
Beta-Counter	TopCount NXT Microplate Scintillation and Luminescence Counter	Packard, Dreieich
Brutschrank	CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Cell-Harvester	Filtermate Harvester Instrument	Packard, Dreieich
Durchflusszytometer	FACScan <i>Software: CellQuest</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroblotter	Multiphor II Biochrom 2103 Power Supply	LKB Pharmacia
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Gel Dokumentation	Gel Doc 2000 <i>Software: Quantity One</i> 4.1.1	Bio-Rad, München
Hybridisierungsschrank	BFD	WTB Binder, Tuttlingen
Mikroskop	Diavert	Leitz, Wetzlar
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer Küvette	Spectrophotometer Quartz- Küvette	Sigma, Deisenhofen
Platten-Photometer	Sunrise Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
SDS-Gel-Gießkammer	BioRad mini Protean II	BioRad, München
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden

Thermocycler	Biometra, TRIO Heated Lid	Biotron, Göttingen
UV-Crosslinker	Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam, NL
Vakuumzentrifuge	Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Göbel für die Überlassung des Themas und seine hervorragende fachliche Betreuung. Die ausgezeichnete Einarbeitung in die Methoden und die stete Bereitschaft zur kritischen Diskussion waren für mich von unschätzbarem Wert.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. B. Kaspers, Frau Dr. C. Deeg und Herrn Dr. J. Cihak danke ich für konstruktive Beiträge, die mir halfen, mein Themengebiet aus anderen Blickwinkeln zu betrachten.

Bärbel Amann, Ursula Holter, Melanie Lorenz und Beatrice Schaerer danke ich für das freundliche Arbeitsklima im Labor und für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt ebenso meinen Mitstreitern, Julia Dreisbach, Thomas Schmalzl, und vor allem Sonja Kothlow, die mir bei der Durchflusszytometrie stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka.

Meinen Eltern, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben, möchte ich an dieser Stelle für ihre Unterstützung danken.

Meinem Mann, Stefan, möchte ich für sein Verständnis und die moralische Unterstützung während meines Studiums und der Promotion herzlich danken.