

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

**Identifizierung und Charakterisierung des differentiell
in dendritischen Zellen exprimierten Genes PTPRO
(GLEPP 1)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Julia Samal, geb. Böttle
aus
Ludwigsburg
2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen	V
Verzeichnis der Abbildungen	X
Verzeichnis der Tabellen	XI
1 Einleitung	1
1.1 Immunsystem	1
1.1.1 Angeborene Immunität	1
1.1.2 Adaptive Immunität	3
1.2 Dendritische Zellen	5
1.2.1 Eigenschaften dendritischer Zellen	6
1.2.2 Subpopulationen dendritischer Zellen	7
1.2.3 Reifung dendritischer Zellen	7
1.2.4 Prozessierung von Antigenen	9
1.2.5 Funktion für Immunität und Toleranz	10
1.2.6 <i>In vitro</i> -Generierung dendritischer Zellen	12
1.3 Genregulation	12
1.3.1 Transkriptionale und posttranskriptionale Regulation	13
1.3.2 Translationale und posttranslationale Regulation	15
1.4 Isolierung differentiell exprimierter Gene: cDNA-Subtraktion	16
1.5 Die Proteintyrosinphosphatase PTPRO	18
1.5.1 Rolle in Immunologie und Hämatologie	21
1.5.2 Rolle in der Onkologie	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial	27

2.1.3	Antikörper und Nukleotide	29
2.1.4	Chemikalien.....	31
2.1.5	Toll-like-Rezeptor-Liganden	33
2.1.6	Kits	33
2.1.7	Medien und Zytokine	34
2.1.8	Puffer.....	35
2.2	Methoden	38
2.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	38
2.2.2	Zellkultur dendritischer Zellen.....	38
2.2.3	Magnetische Zellseparation (MACS)	39
2.2.4	Durchflusszytometrie	39
2.2.5	RNA-Isolierung	41
2.2.6	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	41
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.2.8	Herstellung von Proteinlysaten.....	45
2.2.9	Auftrennung der Proteine durch <i>SDS-PAGE</i>	46
2.2.10	Western Blot.....	48
2.2.11	<i>Stripping</i> von Nitrozellulosemembran	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Phänotypisierung durch FACS-Analysen	51
3.1.1	FACS-Analyse der MACS-isolierten Monozyten.....	51
3.1.2	FACS-Analyse der aus Monozyten gewonnenen dendritischen Zellen.....	53
3.1.3	FACS-Analyse der DMSO behandelten dendritischen Zellen	54
3.1.4	FACS-Analyse der LPS stimulierten dendritischen Zellen.....	55
3.1.5	FACS-Analyse der mit Pam ₃ Cys behandelten dendritischen Zellen.....	56

3.1.6 FACS-Analyse der mit Poly I:C behandelten dendritischen Zellen	57
3.1.7 FACS-Analyse der mit R848 behandelten dendritischen Zellen	58
3.1.8 FACS-Analyse der mit Imatinib behandelten dendritischen Zellen	59
3.1.9 FACS-Analyse der mit IL-10 behandelten dendritischen Zellen	60
3.2 Nachweis der differentiellen Expression von PTPRO in dendritischen Zellen	61
3.2.1 Nachweis der differentiellen Expression des Gens PTPRO/ GLEPP 1 in dendritischen Zellen mittels RT-PCR und Western Blot	61
3.2.2 Nachweis der Spezifität des verwendeten Antikörpers für das Protein PTPRO	63
3.3 Untersuchung der Regulierbarkeit der Genexpression von PTPRO durch Stimulatoren und Inhibitoren	65
3.4 Expression von PTPRO in verschiedenen Subpopulationen von Leukozyten	69
3.4.1 FACS-Analyse der MACS-isolierten B-Lymphozyten	69
3.4.2 FACS-Analyse der MACS-isolierten T-Lymphozyten	70
3.4.3 FACS-Analyse der dendritischen Zellen des peripheren Blutes	72
3.4.4 FACS-Analyse der myeloiden dendritischen Zellen	73
3.4.5 FACS-Analyse der plasmazytoiden dendritischen Zellen	74
3.4.6 Expression von PTPRO in verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen mittels Western Blot	75

4 Diskussion	77
4.1 Nachweis der differentiellen Expression von PTPRO in dendritischen Zellen.....	77
4.2 Spezifität des eingesetzten Antikörpers für PTPRO	79
4.3 Expression von PTPRO in DC-Subpopulationen und Lymphozyten	80
4.4 Einfluss stimulierender Substanzen auf die Expression von PTPRO	81
4.5 Einfluss inhibierender Substanzen auf die Expression von PTPRO	82
5 Zusammenfassung.....	85
Literaturverzeichnis	87
Danksagung.....	98
Lebenslauf	100

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BDCA	<i>blood dendritic cell antigen</i>
β2M	β2-Mikroglobulin
bp	<i>base pairs</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	<i>copy DNA</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CR4	<i>complement receptor 4</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DC-LAMP	<i>dendritic cell-lysosomal associated membrane protein</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEC 205	<i>dendritic and epithelial cell, 205 kDa</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2	<i>eucaryotic initiation factor 2</i>

<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FOX P3	<i>forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidinisothiocyanat
GLEPP 1	<i>glomerular epithelial protein-1</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecules</i>
ICOS-L	<i>inducible costimulator-ligand</i>
IDO	Indoleamin 2,3- Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL3R α	Interleukin-3-Rezeptor-alpha
ILT	<i>immunoglobulin-like transcript</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
MACS	<i>magnetic-associated cell sorting</i>
MAP-ERK	<i>mitogen-activated protein- extracellular signal-regulated kinases</i>
moDC	<i>monocyte-derived dendritic cell</i>

MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
miR-17-92	micro-RNA-Cluster-17-92
miRNA	Micro-RNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Milli-Sekunden
myDC	myeloide dendritische Zellen
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NP40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
OD	optische Dichte (<i>optical density</i>)
OX-40L	OX-40-Ligand
Pam ₃ Cys	N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)- (2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]- lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine
PAMP	pathogenassoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin + Streptomycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase

PTPRO	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, O</i>
PTPRO-FL	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, O, full length</i>
PTPROt	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, O, truncated</i>
R848	Resiquimod
RIPA	Radioimmun-Präzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut: 1640-Zellkulturmedium
R-PTP	Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAGE	Serielle Analyse der Genexpression (serial analysis of gene expression)
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulphate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TATA-Box	T(hymin)-A(denin)-T(hymin)-A(denin)-Box
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline with Tween-20</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TLRL	<i>Toll like receptor ligand</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
U	Uracil
V	Volt

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1	Adhäsionsmoleküle zur Interaktion von APC und CD4 ⁺ -T-Zellen
Abb. 1.2	Kristallstruktur der katalytischen Domäne von PTPRO, Homo sapiens, Nr. 2G59
Abb. 1.3	Protein Isoformen von PTPRO
Abb. 2.2.1	SDS-Gel nach der Auftrennung
Abb. 3.1	FACS-Analyse von MACS-isolierten Monozyten
Abb. 3.2	FACS-Analyse von unreifen moDC
Abb. 3.3	FACS-Analyse von DMSO-behandelten, unreifen DC
Abb. 3.4	FACS-Analyse von LPS-stimulierten, reifen DC
Abb. 3.5	FACS-Analyse von Pam ₃ Cys-behandelten DC
Abb. 3.6	FACS-Analyse von Poly I:C-behandelten DC
Abb. 3.7	FACS-Analyse von R848-behandelten DC
Abb. 3.8	FACS-Analyse von Imatinib-behandelten DC
Abb. 3.9	FACS-Analyse von IL-10-behandelten DC
Abb. 3.10	Untersuchung der Expression von PTPRO. RT-PCR von Monozyten und moDC mit Primerpaar <i>forward</i> und <i>reverse</i> Primer
Abb. 3.11	Untersuchung der Expression von PTPRO. Western Blot von Monozyten und moDC
Abb. 3.12	Western Blot zum Nachweis der Antikörper-Spezifität
Abb. 3.13	RT-PCR: Einfluss von Stimuli auf die Expression von PTPRO
Abb. 3.14	Western Blot: Einfluss von Stimuli auf die Expression von PTPRO
Abb. 3.15	Western Blot: Einfluss von Inhibitoren auf die Expression von PTPRO
Abb. 3.16	FACS-Analyse von MACS-isolierten B-Lymphozyten
Abb. 3.17	FACS-Analyse von MACS-isolierten T-Lymphozyten
Abb. 3.18	FACS-Analyse von MACS-isolierten Blood DC
Abb. 3.19	FACS-Analyse von MACS-isolierten BDCA1 ⁺ Blood DC
Abb. 3.20	FACS-Analyse von MACS-isolierten BDCA2 ⁺ Blood DC
Abb. 3.21	Western Blot: Expression von PTPRO in verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.1	Liganden und Vorkommen der Toll-like Rezeptoren 2, 3, 4 und 7, nach Takeda <i>et al.</i>
Tabelle 2.1.1	Geräte
Tabelle 2.1.2	Verbrauchsmaterial
Tabelle 2.1.3	Antikörper
Tabelle 2.1.4	Chemikalien
Tabelle 2.1.5	Toll-like-Rezeptor Liganden
Tabelle 2.1.6	Kits
Tabelle 2.1.7	Medien und Zytokine
Tabelle 2.1.8	Puffer
Tabelle 2.2.1	Zusammensetzung des cDNA-Mastermix
Tabelle 2.2.2	Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, β_2 -Mikroglobulin
Tabelle 2.2.3	Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, PTPRO
Tabelle 2.2.4	PCR-Programm für β_2 -Mikroglobulin
Tabelle 2.2.5	PCR-Programm für PTPRO
Tabelle 2.2.6	Zusammensetzung des 15%-Polyacrylamid-Trenngels
Tabelle 2.2.7	Zusammensetzung des Sammelgels
Tabelle 3.1	Phänotypisierung von MACS-isolierten Monozyten
Tabelle 3.2	Phänotypisierung von moDC
Tabelle 3.3	Phänotypisierung von MACS-isolierten B-Lymphozyten
Tabelle 3.4	Phänotypisierung von MACS-isolierten T-Lymphozyten
Tabelle 3.5	Phänotypisierung von MACS-isolierten Blood DC
Tabelle 3.6	Phänotypisierung von MACS-isolierten BDCA1 ⁺ Blood DC
Tabelle 3.7	Phänotypisierung von MACS-isolierten BDCA2 ⁺ Blood DC

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Organismus ist ständig der Gefahr ausgesetzt, dass Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Parasiten eindringen und die Intaktheit des Körpers angreifen können. Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor solchen Mikroorganismen, aber auch Toxinen und malignen Zellen zu schützen. Dabei muss es zwischen Fremd und Selbst unterscheiden und verschiedene Signale von beschädigtem Gewebe oder von mikrobiellen Produkten als Gefahr erkennen können [78]. Die Gefahrenerkennung ist eine komplexe Anforderung, da Pathogene sich schnell entwickeln und anpassen, um das Immunsystem zu umgehen. Wenn ein Partikel als fremd identifiziert wurde, muss das System in der Lage sein, eine zuverlässige und schnelle Immunantwort zu triggern.

Ebenso wichtig wie eine spezifische Immunität sind die Prozesse, durch die vermieden wird, dass sich eine autoimmune Aktivität ausbildet; dies wird als Toleranz bezeichnet. Dazu bedarf es auch einer begrenzten Lebensdauer der Immunreaktion.

Der Körper besitzt zwei grundsätzlich verschiedene Abwehrmechanismen, um seine Integrität bei Angriffen von außen zu wahren: die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunreaktion.

1.1.1 Angeborene Immunität

Das System der angeborenen Immunität bildet das erste Hindernis für eindringende Pathogene. Es wirkt in den ersten Stunden und Tagen und unterhält eine Abwehrreaktion gegen Pathogene so lange, bis das erworbene Immunsystem aktiviert ist. Es besteht aus Barriere-bildenden Oberflächen, aus Immunzellen und aus im Serum gelösten (humoralen) Stoffen und ist dadurch gekennzeichnet, dass es kein immunologisches Gedächtnis ausbilden kann.

An allen Epithelien, die mit der Umwelt kommunizieren, wird versucht, Krankheitserreger abzuhalten. Dazu dienen:

- in der Haut die *tight junctions* der Epithelzellen, die residente Flora und antibakterielle Peptide
- im Auge der Tränenfilm und darin enthaltenes Murein spaltendes Lysozym
- in der Lunge die Reinigung durch das Flimmerepithel
- im Darm der niedrige pH-Wert und Enzyme wie Pepsin
- in der Vagina Döderlein-Flora und pH-Wert

Zu den zellulären Komponenten der angeborenen Abwehr gehören Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Mastzellen und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Zellen der angeborenen Immunität erkennen konservierte Strukturmotive auf Krankheitserregern, die als pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP), bezeichnet werden. Die Erkennung wird über Mustererkennungsrezeptoren, die *pattern recognition receptors*, vermittelt; sie binden bspw. Lipopolysaccharide (LPS), Proteoglykane oder nichtmethylierte CpG-DNA. Über diese Mechanismen ist eine Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremdanitigenen bis zu einem gewissen Grad möglich. Nach Erkennung eines Pathogens besteht der erste Anteil der Abwehrreaktion meist in der Aufnahme von Fremdpartikeln durch Phagozyten, also durch Granulozyten und Makrophagen. Diese phagozytierenden Zellen können das Immunsystem in einen generellen Alarmzustand versetzen, während dessen auch im Blutserum gelöste Mediatoren freigesetzt werden [3].

Zu den humoralen Mechanismen gehört das aus diversen Plasmaproteinen bestehende Komplementsystem, dessen Aktivierung zu einer Kaskade von Reaktionen auf der Oberfläche von Mikroorganismen führt. Ein Effekt dieser Kaskade besteht darin, dass Krankheitserreger opsoniert werden, das heißt, dass ihre Oberfläche derart verändert wird, dass sie von Phagozyten aufgenommen werden können. Ein weiteres Ziel der aktivierten Komplementwege ist die Lyse der pathogenen Organismen.

Weitere humorale Effektormechanismen sind Chemokine, die Phagozyten zum Infektionsherd leiten, und Zytokine, die Fieber auslösen und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, z.B. dem C-reaktiven Protein, induzieren. Zytokine mo-

bilisieren weiterhin Antigen präsentierende Zellen (APC, s. Kapitel 1.2), welche die spezifische Immunreaktion auslösen.

Durch virale Infektionen wird zudem die Synthese von Interferonen (IFN) ausgelöst. Ihre Funktion besteht in der Aktivierung von NK-Zellen und der Eindämmung der Virusreplikation. Die NK-Zellen selbst können einige Tumorzellen und beispielsweise durch Herpes-Viren infizierte Zellen erkennen und töten.

Alle diese Mechanismen führen zu einer Entzündungsreaktion, die anschließend zur Initiation der spezifischen adaptiven Immunreaktion führt [85].

1.1.2 Adaptive Immunität

Für das Auslösen einer Reaktion ist das adaptive System zu Beginn auf die Aktivierung von APC angewiesen, die den Übergang von der angeborenen zur erworbenen Abwehr bilden (s.a. Kapitel 1.2). Die Besonderheit der erworbenen Immunität besteht darin, dass sich eine Immunantwort erst während des Kontaktes mit einem Antigen entwickelt und dass sie zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt.

Der zentrale Grundsatz der adaptiven Immunität ist die klonale Selektion der Lymphozyten. Potentiell autoreaktive Lymphozyten und Lymphozyten, die keine Antigene binden können oder nach kurzer Zeit nicht gebunden haben, werden eliminiert. Zellen, die ein Antigen mit ihrem spezifischen Rezeptor erkennen können, vermehren sich hingegen klonal. Bevor es zur Differenzierung kommt, teilt sich der Lymphozyt, damit genügend Effektorzellen zur Bekämpfung der Infektion vorhanden sind. Je nachdem, mit welchen Antigenen das adaptive System in Kontakt kommt, verändert sich also das Repertoire an Immunzellen, das System adaptiert sich. Die entscheidenden Akteure dieses adaptiven Systems sind hochspezifische Immunzellen, die B- und T-Lymphozyten.

Jeder Lymphozyt besitzt Oberflächenrezeptoren nur einer einzigen Spezifität. Dass das System trotzdem schnell und effektiv arbeitet und für sämtliche Pathogene ein passender Rezeptor zur Verfügung steht, wird durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus erreicht. Durch somatische Mutation und

Rearrangement können im Fall der Antikörper bis zu 10^{12} Varianten bereitgestellt werden [85].

B-Lymphozyten reifen im Knochenmark, entwickeln sich zu Plasmazellen und produzieren Antikörper (Immunglobuline). Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Leichte und schwere Ketten besitzen je einen variablen und einen konstanten Bereich, die variablen Regionen legen sich paarweise zusammen. Es entstehen zwei identische Antigen-bindende Stellen an der Spitze, was dazu führt, dass der Antikörper Antigene vernetzen und stabiler binden kann. Immunglobuline haben die Aufgabe, Pathogene zu zerstören. Sie können an Krankheitserreger, besonders Viren, binden und dadurch ihre Wechselwirkung mit anderen Zellen unmöglich machen (Neutralisation) oder die Pathogene opsonieren.

T-Lymphozyten reifen im Thymus und erkennen Peptide von Mikroorganismen. Dabei erkennen sie Peptide nur, wenn sie auf eine bestimmte Art auf Oberflächen präsentiert werden, nämlich an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) gebunden. Diese MHC-Moleküle existieren als MHC-Klasse-I und Klasse-II. Während MHC-I-Moleküle auf nahezu allen kernhaltigen Zellen vorkommen, werden MHC-Klasse-II-Moleküle nur von spezialisierten APC exprimiert. Auf MHC-I-Molekülen werden Peptide aus Proteinen des Zytosols präsentiert, auf MHC-II-Molekülen Peptide, die aus intrazellulären Vesikeln stammen, also von extrazellulär aufgenommen wurden.

Ein Lymphozyt, der durch seinen ersten Kontakt mit einem Antigen aktiviert wurde, bildet durch Proliferation und Differenzierung einen von mehreren Effektorlymphozyten. Im Falle der T-Zellen entstehen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen. $CD8^+$ -Zellen differenzieren sich zu zytotoxischen T-Zellen, $CD4^+$ -Zellen zu T-Helferzellen (T_H -Zellen) und regulatorischen T-Zellen [121].

Zytotoxische T-Lymphozyten sind in der Lage, virusinfizierte oder maligne entartete Zellen zu zerstören. T_H -Zellen nehmen eine organisierende Rolle bei der Entstehung einer spezifischen Immunantwort ein. Über verschiedene Differenzierungswege entstehen T_H1 -Zellen, die bspw. infizierte Makrophagen aktivieren und T_H2 -Zellen, welche die Antikörperproduktion antigenstimulierter B-

Zellen intensivieren. Eine dritte Gruppe von T-Helferzellen sind die T_H17-Zellen, die von Bedeutung für die Mobilisierung neutrophiler Zellen zu Infektionsherden sind. Regulatorische T-Zellen (CD25⁺, *forkhead box (FOX) P3*⁺) unterdrücken lymphozytäre Reaktionen und können so Immunantworten limitieren oder auto-reaktive Aktivität verhindern.

Im weiteren Verlauf der Immunreaktion differenzieren sich einige B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen, durch die das Immunsystem in die Lage versetzt wird, bei einer erneuten Infektion mit einem bereits bekannten Antigen schneller und effizienter reagieren zu können [85].

1.2 Dendritische Zellen

Die Immunologie hat ihr Augenmerk lange auf Lymphozyten und Antigene gelegt, aber die Gegenwart nur dieser beiden Komponenten führt nicht zwingend zu einer Immunantwort. Ein dritter Bestandteil, die Antigen präsentierenden Zellen, zu denen dendritische Zellen (DC) gehören, initiiert erst die Immunreaktion.

Die meisten Körperzellen sind zur Antigenpräsentation fähig, das heißt, dass sie anderen Immunzellen mikrobielle oder maligne Antigene auf MHC-Molekülen vorzeigen, so dass das Antigen als Gefahr erkannt werden kann. Zu den so genannten „professionellen“ APC des Immunsystems zählen jedoch nur DC, Makrophagen und B-Lymphozyten.

Obwohl Langerhans schon 1868 die nach ihm benannten Zellen der Epidermis entdeckte, wurde das Verständnis um ihre Rolle als APC erst 1973 durch die Erkenntnisse von Steinman und Cohn aus ihren Versuchen mit DC aus der Milz von Mäusen etabliert.

DC werden nach dem derzeitigen Modell als potenteste Akteure bei der Initiierung der Immunantwort angesehen. Ihre besondere Funktion besteht darin, dass sie in peripheren Geweben Antigene aufnehmen und sie nach Migration in sekundäre lymphatische Organe den dort residenten T-Lymphozyten präsentieren. Diese naiven T-Zellen werden dadurch aktiviert und es wird eine effektive Immunantwort eingeleitet [20], [73], [58].

1.2.1 Eigenschaften dendritischer Zellen

Um die Interaktion von DC mit anderen Zellen und ihre Funktion veranschaulichen zu können, ist es wichtig, zunächst die für DC typischen Oberflächeneigenschaften darzustellen. Die Unkenntnis dieser Charakteristika machte es für lange Zeit unmöglich, sie von ähnlichen Zellen zu unterscheiden und diese als akzessorische Zellen unterschätzte Population genauer zu erforschen. Heute können DC nicht aufgrund eines einzelnen, jedoch durch eine Kombination von Oberflächenmarkern identifiziert werden.

Zu den charakteristischen Molekülen gehören besonders MHC-Klasse-II-Moleküle und abhängig von der Zellreife die Differenzierungscluster CD1, CD11c, CD83 und CD123 (IL3R α). Ebenso dienen Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7h (ICOS-L), OX-40-Ligand (OX-40L) und CD40 der Identifizierung. Das Transmembranprotein DEC 205 ist darüber hinaus ein typischer Bestandteil von DC. Wie Abbildung 1.1 zu entnehmen ist, dienen viele der genannten Oberflächenmoleküle der zentralen Funktion von DC, nämlich der Interaktion mit T-Lymphozyten.

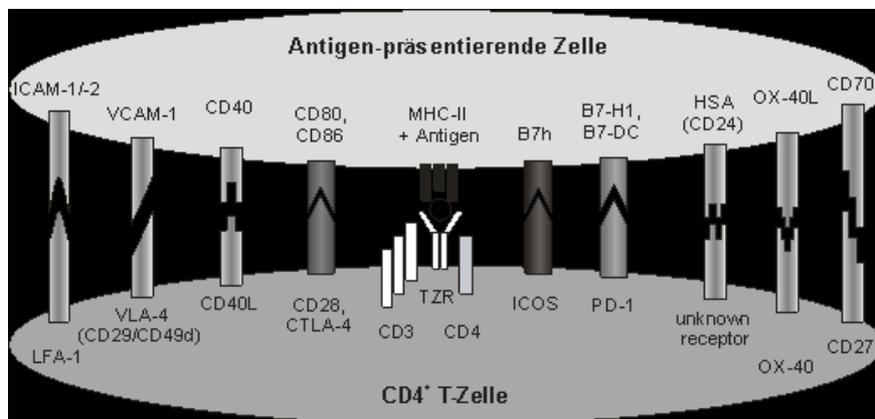


Abb. 1.1: Adhäsionsmoleküle zur Interaktion von APC und CD4⁺-T-Zellen. (Interaktion von T-Zellen mit sinusoidalen Endothelzellen der Leber, Arnhild Schrage, Berlin, 2006)

1.2.2 Subpopulationen dendritischer Zellen

Bei DC handelt es sich um eine sehr heterogene Zellpopulation, die sich aus CD34+ hämatopoietischen Stammzellen entwickelt. Über zwei verschiedene Differenzierungswege entstehen die Hauptgruppen von DC: myeloide DC (myDC), zu denen beispielsweise Langerhans-Zellen und interstitielle DC gehören [18], und plasmazytoide DC (pDC), die lymphoiden Ursprungs zu sein scheinen [34], [74]. Sie unterscheiden sich sowohl in ihren Oberflächenmarkern als auch in ihrer ausgeübten Funktion. MyDC besitzen CD11c, das als Rezeptor für ein Komplementspaltprodukt und ICAM-1 dient, jedoch wenig CD123. PDC exprimieren keine großen Mengen an CD11c, sind jedoch charakterisiert durch CD123 und spezifische Marker wie BDCA4 und BDCA2, ein C-Typ-Lektin, das wahrscheinlich an der Pathogenerkennung beteiligt ist [88], [89], [85].

Nach der anatomischen Lokalisation lassen sich DC in Langerhanszellen der Epidermis, dermale oder interstitielle DC, interdigitierende DC der T-Zell-Zonen, Marginalzonen-DC der Milz, DC des peripheren Blutes, Thymus-DC und Leber-DC einteilen. Bisher sind die jeweilige Herkunft und Funktion der Subpopulationen nicht ausreichend bekannt, obwohl phänotypische Unterschiede bestehen [18], [31].

1.2.3 Reifung dendritischer Zellen

Drei Differenzierungsphasen werden von allen DC-Subtypen durchlaufen: DC-Vorläuferzellen, unreife und reife DC [109]. Unter Reifung versteht man einen Differenzierungsprozess, während dessen sich DC von Zellen, die auf Antigenaufnahme spezialisiert sind, zu T-Zell-aktivierenden Zellen verändern. Dieser wird durch Bestandteile von Pathogenen oder Wirtsmolekülen induziert, die mit Inflammation oder Gewebeverletzung assoziiert sind. Reifungssignale wirken auf DC über Rezeptoren ein, die intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen. Dazu gehören Rezeptoren für inflammatorische Moleküle wie CD40-Ligand (CD40L), TNF α , Interleukin (IL) 1 und IFN- α . Mikrobielle Produkte vermitteln Reife-induzierende Signale über Toll-like-Rezeptoren (TLR), dies sind Transmembranrezeptoren, die auf DC und anderen Zelltypen exprimiert werden und

mit dem Protein Toll aus *Drosophila* verwandt sind [117]. Es gibt elf bekannte TLR, die jeweils ein spezifisches Expressionsmuster besitzen und verschiedene Gruppen molekularer Muster erkennen. TLR4 ist beispielsweise für die Erkennung von LPS und damit für die Einleitung der Immunantwort gegen gramnegative Erreger verantwortlich, TLR2 identifiziert Proteoglykane grampositiver Erreger [116], [90]. Beim Menschen exprimieren myDC TLR1 bis 5 und teilweise TLR7 oder 8. pDC exprimieren TLR1 und im Gegensatz zu myDC die intrazellulären TLR7 und TLR9 [70], [64], [69]. Die einzelnen Signalwege können die Richtung der T-Zell-Antwort beeinflussen [4].

Tabelle 1.1 veranschaulicht die zu den TLR2, 3, 4 und 7 gehörenden Liganden und ihr Vorkommen in verschiedenen DC-Subpopulationen.

Tabelle 1.1: Liganden und Vorkommen der Toll-like Rezeptoren 2, 3, 4 und 7, nach Takeda *et al.* vereinfacht dargestellte Tabelle (Takeda *et al.* 2003, [105])

TLR	Ligand	Vorkommen in DC-Subpopulation
TLR2	Peptidoglykan, Lipoteichonsäure	myDC
	Lipoproteine, Lipidoarabinomannan	unreife DC
	Zymosan, Atypisches LPS	
	Glycophosphatidylinositol (GPI)	
	HSP (<i>heat shock protein</i>) 70	
TLR3	Doppelsträngige RNA	nur reife DC
	Poly I:C, siRNA, mRNA	myDC
TLR4	LPS, Taxol	myDC
	Fibronektin, Peptidoglykane	unreife DC
	F-Protein (Fusions-Protein)	
	HSP 60, HSP 70, Hyaluronsäure	
	Heparansulfat-Fragmente	
TLR7	Imidazoquinoline u.a.	plasmazytoide DC,
	Einzel- und doppelsträngige RNA	fraglich auch in myDC

Der Reifungsprozess ist gekennzeichnet durch reduzierte Phagozytoseaktivität, Entwicklung zytoplasmatischer Ausläufer, Migration in lymphatische Gewebe und erhöhtes Potential, T-Zellen zu aktivieren. Im Zuge der Reifung kommt es auch zu Veränderungen, die mit der Entwicklung zu einer professionellen Antigen präsentierenden Zelle einhergehen: Translokation von MHC-II-Molekülen zur Zelloberfläche [123], Hochregulation von kostimulierenden Molekülen wie B7.1 und B7.2 und Sekretion von Zytokinen wie IL-12 [65], [106], [88]. Reife DC exprimieren mehrere charakteristische Marker wie CD83 [25], [127] und DC-LAMP, ein DC-spezifisches lysosomales Protein [41].

1.2.4 Prozessierung von Antigenen

Sowohl Infektionserreger als auch abgestorbene Zellen, Immunkomplexe und Proteine können Antigene darstellen, die durch Phagozytose, Endozytose oder Makropinozytose von DC aufgenommen werden.

Die verschiedenen Antigene werden in DC nach der Aufnahme zu Peptiden prozessiert. Bakterien und Viren werden häufig über phagozytotische Rezeptoren, wie DEC 205 aufgenommen. Sie werden in Lysosomen abgebaut und ihre Peptidfragmente auf MHC-II-Molekülen den CD4⁺-T-Zellen präsentiert [58].

Antigene, die im Zytosol akquiriert wurden, werden typischerweise prozessiert und auf MHC-I-Oberflächenmoleküle geladen. Auf diese Weise können bspw. bei einer Virusinfektion der DC selbst, Virusantigene naiven CD8⁺-T-Zellen präsentiert und eine lymphozytäre Immunreaktion induziert werden.

Es existiert zusätzlich ein alternativer Weg von DC, exogene Antigene auf MHC-Klasse-I zu prozessieren. Dieser Weg, genannt Kreuzpräsentation, erlaubt DC CD8⁺- und CD4⁺-T-Zell-Antworten gegen exogene Antigene wie nekrotische Tumorzellen, Virus-infizierte Zellen oder Immunkomplexe hervorzurufen. Die Kreuzpräsentation ist an spezifische Antigen-Aufnahmerezeptoren von DC gebunden und ist vermutlich nicht nur für zytotoxische T-Zell-Antworten, sondern auch für Toleranzmechanismen von Bedeutung [57], [48], [1], [61].

Wie beim Herpes-simplex-Virus gezeigt wurde, gibt es noch einen zusätzlichen Weg der Antigenpräsentation. Langerhans-Zellen präsentieren ihr Antigen in

Lymphknoten nicht selbst, sondern ein Teil der Antigene wird zuvor auf eine CD8⁺ Subpopulation von DC übertragen [9].

1.2.5 Funktion für Immunität und Toleranz

Die Funktion der pDC besteht darin, als Antwort auf virale Infektionen sehr große Mengen von IFN- α und - β zu sezernieren [110]. Dies wird zum Beispiel über TLR7 und 9 vermittelt, die Erkennungsmuster von DNA-Viren identifizieren können. Die Sekretion der IFN beeinflusst entscheidend den Verlauf von Infektionen durch Aktivierung von DC und die Regulation der Freisetzung anderer Zytokine, zum Beispiel IL-12 [24]. Es gibt Hinweise, dass sie die Immunreaktion dabei in Richtung einer T_H2-vermittelten Antwort lenken [35], [47], [17], [74]. Für die Interaktion von pDC und T-Lymphozyten scheint das kostimulierende Molekül ICOS (*inducible T-cell costimulator*) eine sehr wichtige Rolle zu spielen [67].

MyDC haben zwei Hauptfunktionen: die Induktion spezifischer Immunantworten gegen Pathogene und das Aufrechterhalten der Selbsttoleranz [20], [114]. Sie sind darauf spezialisiert nach der Einwanderung in regionäre Lymphknoten eine Interaktion mit naiven T-Zellen einzugehen, die sich daraufhin teilen und zu Effektorzellen ausreifen. Sie können dabei den Typ und die Ausprägung der T-Zell-Antwort beeinflussen. Die Stärke der Antwort ist abhängig von der Konzentration des Antigens, der Affinität des T-Zell-Rezeptors für das korrespondierende MHC-Molekül und dem Stadium der DC-Reifung. So führt die Stimulation durch reife DC zu längerfristigem Überleben der T-Lymphozyten und Differenzierung in Gedächtnis- und Effektorzellen, Stimulation durch unreife DC hingegen nur zu kurzem Überleben (abortive Proliferation) [51].

Bei der Interaktion zwischen T-Zellen und DC sind Adhäsionsmoleküle beider Zellen von großer Bedeutung. Zu Beginn kommt es zur Bindung von MHC-Molekülen an den T-Zell-Rezeptor. Gleichzeitig interagieren die B7-Moleküle B7-1 und B7-2 als wichtigste kostimulierende Moleküle der T-Zellen mit dem CD28-Molekül und führen so zu klonaler T-Zell-Proliferation. CTLA-4 (CD152) ist ein Homolog zu CD28, besitzt jedoch eine mehrfach höhere Bindungsavidität für B7. Es entfaltet inhibitorische Aktivität und begrenzt so die Proliferation aktivierter T-Zellen.

Eine bedeutende Interaktion, die zur Aktivierung beider Zellen führen kann, findet zwischen dem CD40-Rezeptor von DC und dem CD40L der T-Zelle statt. Es gibt Hinweise dafür, dass diese Interaktion speziell zwischen CD4⁺-T-Zellen und DC Mechanismen vermittelt, die zur Gedächtnisbildung bei CD8⁺-T-Lymphozyten beitragen [98]. Die Bindung von ICOS auf aktivierten T-Zellen und ICOS-Ligand auf DC reguliert die Zytokinexpression und kann die Effektorfunktion von T_H1- und T_H2-Zellen verstärken [126], [85].

Doch DC besitzen eine weitere wichtige Funktion. Neben der Initiation von Immunantworten sind sie beteiligt an Mechanismen, die zu Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen führen. Im Thymus wird die zentrale Toleranz durch Apoptoseinduktion bei potentiell autoreaktiven T-Zellen von Thymus-DC vermittelt [29]. An der peripheren Toleranz wirken DC ebenso mit, über welche Mechanismen dies geschieht, ist jedoch noch nicht vollkommen geklärt. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass Subtypen spezialisierter regulatorischer DC an der Induktion von Toleranz beteiligt sind [45], [111]. Beispielsweise konnte ein spezieller Subtyp von DC identifiziert werden, derIDO exprimiert (Indoleamin-2,3-Dioxygenase), welches in den Tryptophan-stoffwechsel involviert ist. Dieser Subtyp vermittelt die Hemmung der T-Zell-Proliferation und Apoptoseinduktion bei T-Lymphozyten [45].

Periphere Toleranz soll besonders von unreifen DC vermittelt werden. Bonifaz *et al.* konnten dementsprechend zeigen, dass Antigen-gepulste unreife DC die Fähigkeit besitzen, regulatorische T-Zellen (CD25⁺, FOXP3⁺) zu induzieren, die vermutlich entscheidend an der Induktion von Selbst-Toleranz beteiligt sind und Anergie gegen das beteiligte Antigen bewirken [26], [71], [76]. Es existiert jedoch auch das Konzept, dass Toleranz von reifen, aber ruhenden DC induziert wird, wohingegen Immunität von vollständig aktivierten DC induziert wird [7], [108], [28].

Substanzen wie IL-10 können die Reifung von DC unterbinden und die Toleranz-induzierenden Eigenschaften zusätzlich verstärken. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das die Funktion von DC inhibieren kann, indem es die Chemokinexpression verändert, die Zytokinproduktion vermindert und die

Antigenpräsentation beeinflusst [11], [10], [33], [113]. In unreifen DC hemmt es die IL-12-Produktion und beeinträchtigt so die Fähigkeit der DC, die T-Zell-Aktivierung zu stimulieren. So trägt IL-10 dazu bei, die über DC vermittelte Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen aufrecht zu erhalten [42].

1.2.6 *In vitro*-Generierung dendritischer Zellen

DC lassen sich *in vitro* aus CD14⁺ Monozyten durch Inkubation mit IL-4 und GM-CSF kultivieren [19], [36], [97], [96]. Solche DC (moDC) befinden sich in einem unreifen Zustand und ihre Eigenschaften ähneln interstitiellen DC [18]. Ebenso können aus den physiologischen Vorläufern, den CD34⁺ Stammzellen, mit Zytokingemischen aus z.B. GM-CSF, Flt3L, CD40L, TNF α , *stem cell factor* (SCF) oder TGF β DC gewonnen werden [31], [34]. Sie sind ähnlich effektiv in der Phagozytose und Prozessierung wie reife DC, besitzen allerdings reduzierte immunstimulatorische Eigenschaften [32], [30].

Die Immunogenität der zunächst unreifen DC kann durch proinflammatorische Zytokine wie CD40L [46] oder TNF α , durch Bakterienbestandteile wie LPS oder durch synthetische Substanzen wie das dsRNA-Analogon Poly I:C gesteigert werden [44], [72], [31], [100].

1.3 Genregulation

Über Mechanismen der Genregulation wird festgelegt, welche von Genen kodierten Proteine in welcher Konzentration in der Zelle vorliegen sollen. Etwa 1000 Gene, die sogenannten Haushaltsgene (*house keeping genes*), werden in fast allen Zellen eines Organismus transkribiert. Andere Gene werden differenziell exprimiert, d. h. nur in bestimmten Zelltypen und zu bestimmten Zeiten transkribiert. Man unterscheidet im Allgemeinen transkriptionale und translationale Regulation. Auf den folgenden Ebenen der Proteinbiosynthese kann die Regulation umgesetzt werden:

- Initiation der Transkription
- Termination der Transkription
- *Capping*

- Polyadenylierung
- Spleißen
- Transport ins Zytoplasma
- Stabilität der mRNA im Zytoplasma
- Initiation der Translation
- posttranslationale Modifikationen

1.3.1 Transkriptionale und posttranskriptionale Regulation

Die Kontrolle des Transkriptionsbeginns ist für die meisten Gene die normale Form der Kontrolle, da nur so verhindert werden kann, dass nicht benötigte Produkte in der Zelle anfallen. Der erste Schritt, die Regulation des Transkriptionsstarts, entscheidet darüber, ob ein Gen abgelesen wird oder nicht. Im Bereich von Promotoren wird diese Entscheidung gefällt, indem Genregulatorproteine an sie binden. Dies sind Proteine, die die Transkription hemmen oder aktivieren können. Promotoren bestimmen die Initiationsstelle der Transkription und den Bereich, an den die RNA-Polymerase II als Katalysator der prä-mRNA-Bildung direkt bindet. In eukaryotischer DNA sind bis jetzt drei verschiedene Typen von Promotorsequenzen bekannt. Am häufigsten ist die TATA-Box, die für schnell transkribierte Gene charakteristisch ist. Die RNA-Polymerase II benötigt mehrere allgemeine Transkriptionsfaktoren, um den korrekten Startpunkt auf einer DNA-Matrize anzusteuern und die Transkription in Gang zu setzen. Transkriptionsfaktoren binden an Sequenzelemente oder Enhancer-Sequenzen in der eukaryotischen DNA, die dem Promotor vorgeschaltet sind. Durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren kommt es zur Konformationsänderung des Chromatins. Die Anlagerung der DNA-Polymerase wird erleichtert und die Transkription gestartet. Wenn Transkriptionsfaktoren zusammenarbeiten, ist der gemeinsame Effekt nicht nur die Summe der Verstärkungen, sondern das Produkt dieser Verstärkungen (transkriptionale Synergie). Transkriptionsfaktoren besitzen einige typische Struktur motive, mit denen sie an die DNA binden. Zu den häufigsten Struktur motiven zählen die Homöodomäne, die basische Zipperdomäne (Leucin-Zipper-Domäne), das Helix-Schleife-Helix-Motiv und verschiedene Typen der Zinkfinger [75].

Die posttranskriptionale Kontrolle reicht von der Transkriptionsabschwächung über die Regulation der RNA-Prozessierung bis hin zum kontrollierten mRNA-Export und -Abbau.

Die Expression bestimmter Gene wird durch eine vorzeitige Beendigung der Transkription gehemmt, dies wird als Transkriptionsabschwächung (attenuation) bezeichnet.

Eukaryotische prä-mRNAs werden durch Anfügen einer 5'-Cap-Gruppe, 3'-Spaltung und Polyadenylierung sowie durch RNA-Spleißen prozessiert. Cap und poly-A-Schwanz gelten als eine Art von natürlichem Schutz gegen den Abbau zytoplasmatischer mRNA. Die reife mRNA ist der schrittweisen Verkürzung des poly-A-Schwanzes durch 3'-5'-Exonukleasen ausgesetzt. Alternativ kann der poly-A-Schwanz auch als Ganzes durch eine Endonuklease abgetrennt werden. Beide Abbauvorgänge können durch Regulatorproteine, die am 3'-Ende binden, beschleunigt oder gebremst werden [8].

Ein wesentlicher Mechanismus der Genregulation ist das Spleißen, der Prozess, bei dem die Intronsequenzen aus den prä-mRNAs entfernt und die Exons miteinander verbunden werden. Eine Zelle kann das primäre Transkript auf verschiedene Weise spleißen und dadurch unterschiedliche Polypeptidketten aus demselben Gen herstellen – dies wird als alternatives Spleißen bezeichnet. Falls es verschiedene Spleißmöglichkeiten an mehreren Stellen eines Transkripts gibt, kann ein einzelnes Gen zu Dutzenden von Proteinen führen. Die Regulation erfolgt über Spleißfaktoren. Dies sind Proteine, die Signale auf der RNA erkennen und die Auswahl der Spleißstellen beeinflussen. In vielen Fällen lässt sich das alternative Spleißen regulieren, indem Spleißaktivatoren mit den Spleißfaktoren in Wechselwirkung treten und so deren Assoziation mit der regulierten Spleißstelle unterstützen. Spleißinhibitoren dagegen blockieren wahrscheinlich durch sterische Mechanismen die Anlagerung von Spleißfaktoren. RNA-bindende Proteine, die an spezifische Sequenzen in der Nähe regulierter Spleißstellen binden, können das alternative Spleißen ebenfalls beeinflussen. Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Spleißmöglichkeiten. Beispielsweise können Exons übersprungen oder Introns beibehalten werden.

Durch eine Überlappung von Spleißstellen können sich Exons gegenseitig ausschließen. Außerdem existieren optionale 5' oder 3' Spleißstellen innerhalb von Exons beziehungsweise Introns. Alternatives Spleißen geschieht nicht selten in einer zelltypspezifischen Weise, so dass verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Transkripten ein und desselben Gens ausgestattet sind. Man kennt z.B. spezielle, zelltypspezifisch exprimierte SR-Proteine, die an Exon-Enhancer binden und dort den Zusammenbau von Spleißosomen fördern [94].

Für die Termination der Transkription besitzen Eukaryonten verschiedene Regulationsmechanismen. Es können Terminationsfaktoren benötigt werden oder die Transkription wird nach dem Einbau von mehreren Uracil-Nukleotiden beendet.

Wenn die mRNA fertig prozessiert ist, wird sie ins Zytoplasma transportiert. Hierzu wird die mRNA mit verschiedenen Proteinen zu einem Ribonukleinkomplex zusammengefügt, der durch die Kernporen wandern kann. Die Effizienz dieses Vorgangs bestimmt die Menge an mRNA im Zytoplasma und kann von verschiedenen Faktoren reguliert werden.

Einmal im Zytoplasma angekommen, bleiben einige mRNAs über viele Stunden lang erhalten, während andere innerhalb von Minuten abgebaut werden. Die Expression genetischer Aktivität wird so in vielen Fällen maßgeblich durch die Stabilität der mRNA bestimmt. Die Halbwertszeit des Überlebens wird durch Sequenzelemente der betreffenden mRNAs bestimmt. mRNAs mit ungewöhnlich kurzen Halbwertszeiten enthalten in ihrer nichttranslatierten 3'-Region in wiederholter Folge die Sequenz AUUUA. Aufgrund eines noch unbekanntes Mechanismus stimulieren diese AU-reichen Sequenzen den Abbau der mRNA [75].

1.3.2 Translationale Regulation und posttranslationale Modifikation

Die Initiation der Translation ist bei einigen Genen der wichtigste Regulations-schritt. Zunächst wird ein aus verschiedenen Proteinen bestehender Präinitiationskomplex gebildet, der mit der kleinen Untereinheit eines Ribosoms interagiert. Dieser Komplex erkennt dann die Translationsstartstelle. Die Möglichkei-

ten der Regulation sind hierbei wiederum sehr vielfältig. Sie reichen von der Verwendung spezifischer Initiationsfaktoren bis hin zu einer generellen Abschaltung der Initiation, die erreicht werden kann, indem ein Serinrest eines Proteins des Präinitiationskomplexes (eIF2) phosphoryliert wird. Die Translation einiger mRNAs werden durch *Antisense*-RNA blockiert, die mit dem 5'-Ende der mRNA hybridisiert und dadurch die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit verhindert. Auch microRNAs (miRNAs) spielen bei der Translationsregulation eine große Rolle. MiRNAs sind kleine nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression regulieren, indem sie mit komplementären Sequenzen hybridisieren, die meist in der nichttranslatierten 3'-Region kodierender Transkripte lokalisiert sind. Dies führt entweder zur Inhibition der Translation oder reduzierter mRNA-Stabilität [75].

Die Zelle kann auch noch nach der Translation den Proteinpool regulieren. Hierbei unterscheidet man zwischen Modifikation und Reifung eines Proteins. Proteine können auf verschiedene Weise chemisch modifiziert werden, wobei diese Veränderungen in den meisten Fällen reversibel sind. Beispiele hierfür sind Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Glykosylierung. Im Gegensatz zur chemischen Modifikation stellt die Reifung eines Proteins einen irreversiblen Prozess dar. So werden einige Proteine erst nach Spaltung durch Proteasen aktiv. Die Lebensdauer eines Proteins wird durch das Verhältnis von Synthese und Degradation bestimmt und variiert in einem großen Bereich [68].

1.4 Isolierung differentiell exprimierter Gene: cDNA-Subtraktion

Die subtraktive cDNA-Hybridisierung ist eine leistungsfähige Methode, die den Vergleich zweier mRNA-Populationen ermöglicht und Nukleotidssequenzen liefert, welche nur in einer von zwei Zellpopulationen, z.B. Monozyten oder DC, exprimiert werden. Um differentiell in DC exprimierte Gene zu identifizieren, wurde das Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit wie folgt eingesetzt.

Zunächst werden mRNA-Proben von DC und Monozyten in cDNA umgeschrieben. Dabei wird die cDNA, die differentiell exprimierte Gene enthält, als *tester* und die Vergleichs-cDNA als *driver* bezeichnet. Nach der Fragmentierung bei-

der cDNA-Populationen durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Rsa I, das eine 4-Basen-Erkennungssequenz besitzt, wird jeweils die Hälfte des *testers* mit einem unterschiedlichen cDNA-Adapter ligiert. Bei einer ersten Hybridisierung wird den *tester*-Proben *driver* im Überschuss zugegeben und durch Denaturierung die Anlagerung erreicht. Es findet ein Ausgleich der Konzentrationsunterschiede zwischen den differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten statt. Dies erfolgt über eine Reaktion mit Kinetik zweiter Ordnung, in der eine schnellere Wiederanlagerung für die in hoher Konzentration vorliegenden Moleküle erfolgt. Nun wird nach Mischung ohne vorherige Denaturierung der Proben eine zweite Hybridisierungsreaktion durchgeführt. Es können sich jetzt nur die übrig gebliebenen cDNA-Abschnitte als Hybride zusammenlagern. Diese Hybride beinhalten vorwiegend differentiell exprimierte cDNA-Fragmente und besitzen zwei unterschiedliche Adapter an den Enden. Dies ermöglicht ihre exponentielle Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit spezifisch an die Adaptern bindenden Primern. Die so angereicherten, differentiell exprimierten Genfragmente können im Anschluss kloniert und identifiziert werden.

Entsprechend dieses Vorgehens wurde auch PTPRO/GLEPP 1, das Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, als Kandidat für ein differentiell in DC exprimiertes Gen identifiziert. Das bedeutet, dass dieses Gen in DC, nicht aber in Monozyten exprimiert wird.

Aufgrund der Nukleotidsequenz von PTPRO wurden Primer hergestellt, die an die folgenden Transkriptvarianten binden: PTPRO Transkriptvariante 5 (NM_030671.1) mit einer Länge von 4064 bp, das für die Protein-Isoform c (NP_109596.1) kodiert, und PTPRO Transkriptvariante 6 (NM_030670.1) mit einer Länge von 3980 bp, das für die Protein-Isoform d (NP_109595.1) kodiert [130].

1.5 Die Proteintyrosinphosphatase PTPRO

PTPRO (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, O*) gehört zur Enzymgruppe der Proteintyrosinphosphatasen (PTP) und wird ebenfalls als GLEPP 1 (*glomerular epithelial protein-1*), PTP-U2, PTP-oc, CRYP2 oder PTP-BK bezeichnet.

Die Tyrosinphosphorylierung ist ein entscheidender Kontrollmechanismus für die Regulation des Zellüberlebens, der Proliferation, Zellmorphologie und -beweglichkeit. Eine besondere Rolle spielt sie für die Kontrolle der intrazellulären Signaltransduktion. Die Balance der Proteintyrosinphosphorylierung wird durch die koordinierte Aktivität von Proteintyrosinkinasen (PTK) und PTP kontrolliert. Dabei besteht die Aufgabe der PTP darin, angeheftete Phosphatreste hydrolytisch abzuspalten. Häufig sind die betroffenen Enzyme im phosphorylierten Zustand aktiv und im dephosphorylierten Zustand inaktiv bzw. umgekehrt. PTP lassen sich in vier Klassen einteilen: klassische Rezeptor-PTP (R-PTP), klassische Nicht-Rezeptor-PTP, dualspezifische PTP und niedermolekulare PTP [12].

PTPRO/GLEPP 1 gehört zu den Typ III Rezeptor-PTP und ist ein integrales Membranprotein. Es weist intrazellulär eine einzelne katalytische Domäne (siehe Abbildung 1.2), in der Extrazellulärregion acht Fibronectin-Typ III-ähnliche Domänen und vierzehn putative N-Glykosylierungsstellen sowie eine einzelne Transmembrandomäne auf [5], [101], [91].

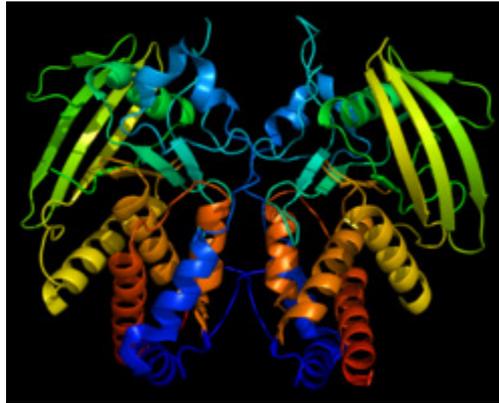


Abb. 1.2: Kristallstruktur der katalytischen Domäne von PTPRO, Homo sapiens, Nr. 2G59. (protein data bank, Kumaran, D., Swaminathan, S., Burley, S.K., New York SGX Research Center for Structural Genomics (NYSGXRC))

Das für PTPRO kodierende Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 12 (12p13.2-p13.3). Es sind sechs mRNA-Varianten des menschlichen PTPRO bekannt, die für vier verschiedene Proteine kodieren [13]. Die zwei Haupttranskripte sind ein langes (*full length*, PTPRO-FL) und ein verkürztes (*truncated*, PTPROt) Transkript. Sie unterscheiden sich nur in ihrer N-terminalen extrazellulären Domäne (siehe Abb. 1.3). Aus jeder dieser Formen können durch alternatives Spleißen von Exon 17 zwei verschiedene Isoformen entstehen. Die vier Isoformen a, b, c und d besitzen ein Molekulargewicht von etwa 138 kDa, 135 kDa, 47 kDa und 43 kDa. PTPRO-FL cDNA kodiert die PTP mit ausgedehnter extrazellulärer Domäne und wird auf hohem Niveau in Niere und Gehirn exprimiert [128], [131], während die verkürzte Form PTPROt in menschlichen Lymphozyten gefunden wird [5]. PTPRO/GLEPP 1 wird auf unterschiedlichem Niveau in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert [102], [5]. Die Analyse der genomischen Struktur von PTPRO deutet darauf hin, dass die einzigartige nichttranslatierte 5'-Region von PTPROt auch als Intron wirkt, das aus der längeren PTPRO Sequenz herausgespleißt wird [5], [38].

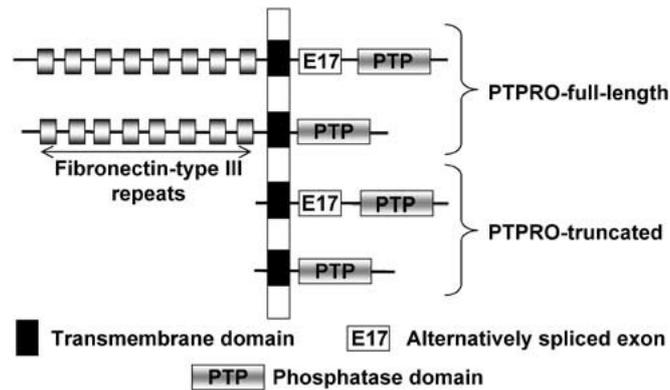


Abb. 1.3: Protein Isoformen von PTPRO. Die vollständige (*full-length*) und verkürzte (*truncated*) Isoform unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer extrazellulären Domäne (Fibronectin-Typ-III-Motive). Aus jeder dieser Formen können durch alternatives Spleißen zwei Isoformen entstehen, indem E17 herausgespleißt wird. (Epigenetic regulation of protein tyrosine phosphatases: potential molecular targets for cancer therapy, Samson T Jacob, Tasneem Motiwala, Cancer Gene Therapy, 2005)

Je nach Organsystem sind spezifische Funktionen von PTPRO bekannt. In der Niere, dem Organ, in dem PTPRO 1993 mit Hilfe einer cDNA-Bibliothek zuerst beschrieben wurde, wird es an der apikalen Oberfläche der Podozytenfüße exprimiert [120]. Damit dient es als Podozytenmarker und ist bei Nierenerkrankungen wie der IgA-Nephropathie reduziert [37], [122], [92], [21].

Im Nervensystem wird es für Axonwachstum und -lenkung in sich entwickelnden Extremitäten von Vertebraten benötigt [115]. Ebenso soll es an der Differenzierung und Aussprossung sensorischer Neurone involviert sein, da PTPRO-*Knockout*-Mäuse Störungen der Nozi- und Propriozeption aufweisen [53].

Im Skelettsystem führt das PTPRO-Protein zu erhöhter Osteoklastenaktivität mit Abnahme der Knochendichte. Es wird vermutet, dass die Interaktion zwischen Östrogen und der PTPRO-Signalkaskade daran beteiligt ist, da der Knochenabbau bei ovariectomierten Mäusen beobachtet wurde [107], [54, 55].

1.5.1 Rolle in Immunologie und Hämatologie

Es ist bekannt, dass hämatopoietische Zellen mehrere R-PTP auf hohem Niveau exprimieren [49], [86], [118]. Als Vertreter dieser Enzymgruppe spielt PTPRO eine bedeutende Rolle bei wichtigen Signalkaskaden von Leukozyten.

PTPROt ist beteiligt an der Syk-Signalkaskade der B-Zellen, die Einfluss auf die B-Zell-Reifung, Eintritt in Lymphfollikel, Rezirkulation und Verstärkung des B-Zell-Rezeptor-Signals hat [39], [124], [125], [50], [95]. Genauer gesagt inhibiert die Überexpression von PTPROt die B-Zell-Rezeptor-getriggerte Syk-Phosphorylierung und spätere Komponenten der Signalkaskade wie die MAP/ERK-Aktivierung [38].

Neben seiner Rolle in B-Zellen reguliert Syk in Leukozyten Immunrezeptor-assoziierte Signalwege und Integrin-Signalkaskaden [22], was die Möglichkeit nahe legt, dass Syk-Modulation durch PTPROt eine wichtige Rolle in zusätzlichen Zelltypen spielen könnte [38]. Gobert *et al.* konnten dementsprechend zeigen, dass Syk und Paxillin, die an der Zellbeweglichkeit von Leukozyten in Chemotaxis beteiligt sind, als Substrate von PTPRO fungieren. PTPRO-Inhibitoren verhindern die Phosphorylierung von Syk1 und Paxillin und blockieren die Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen. In Krankheitsmodellen reduzieren PTPRO-Inhibitoren signifikant die Ausprägung der allergischen Dermatitis und der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich die pharmakologische Inhibition von PTPRO für einen therapeutischen Einsatz eignet [52].

PTPRO/GLEPP 1 ist ebenfalls in die Megakaryozytopoese involviert, wobei sich eine Assoziation zwischen PTPRO und dem c-kit-Rezeptor zeigte. Es wurde demonstriert, dass der SCF/Kit-Ligand in der Lage ist, eine rasche Tyrosinphosphorylierung von PTPRO zu induzieren [118].

Zelldifferenzierungsmechanismen stellen eine weitere interessante Facette der PTPRO-Funktion dar. In der Leukämiezelllinie U937, die PTPRO exprimiert, ist die PTP an der Differenzierung von malignen Zellen in Monozyten durch Phorbolster beteiligt. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die

PTP-Funktion Anteil an mehreren verschiedenen Signalwegen während der Differenzierung von Leukämiezellen hat [103].

1.5.2 Rolle in der Onkologie

PTPRO wird interessanterweise nicht nur in Leukämiezellen, sondern auch in zahlreichen anderen Malignomen exprimiert.

Motiwala *et al.* konnten nachweisen, dass das Gen durch Promoter-Methylierung in primären Hepatomen und bei der chronischen lymphatischen Leukämie supprimiert wird [81], [84]. Darüber hinaus führte die ektopische Expression in einer Bronchialkarzinomzelllinie zur Inhibition verankerungs-unabhängigen Wachstums. Dazu passend ist PTPRO bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen, Leukämiezellen und Bronchialkarzinomen an Apoptose und verzögertem Wiedereintritt in den Zellzyklus funktionell beteiligt [104], [5], [82].

Aufgrund dieser Resultate wurde die Hypothese aufgestellt, dass PTPRO als Tumorsuppressor fungiert. Dass der Genlokus von PTPRO 12p12.3 bei verschiedenen Karzinomen durch *loss of heterozygosity* charakterisiert ist, stützt die Hypothese zusätzlich [66], [82].

Kürzlich wurde die Gruppe der Malignome, in deren Genese PTPRO involviert ist, um zwei weitere Entitäten erweitert. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von PTPRO in Mammakarzinom-Zelllinien signifikant reduziert ist. Der PTPRO-Promoter besitzt zudem Östrogen-responsive Elemente und die Behandlung von Zellen mit 17 β -Östradiol reduziert die PTPRO-Expression. Daher scheint die Östrogen-vermittelte Suppression von PTPRO eines der frühen Ereignisse in der Tumorgenese darzustellen [93].

Zum anderen konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass PTPROt bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) die Funktion von bcr/abl inaktivieren kann. Das bcr/abl-Fusionsprotein entsteht durch die Fusion der c-abl-Kinase mit bcr (*breakpoint cluster region*), was zu konstitutiver Aktivierung der Kinase und dadurch zu unkontrollierter Proliferation mit Leukämieentstehung führt. Im Einzelnen bewirkte die ektopische Expression von PTPROt Hypophosphorylierung des Fusionsproteins bcr/abl und der nachgeschalteten Zielproteine CrkL und

Stat5. Außerdem verursachte die Expression von PTPROt eine Inhibition des verankerungsunabhängigen Wachstums, der Proliferation sowie des Tumorstadiums und erhöhte ihre Suszeptibilität gegenüber Apoptose. Aufgrund der Ergebnisse wurde der Schluss gezogen, dass die Suppression von PTPROt zu vermehrter Phosphorylierung und konstitutiver Aktivität seines Substrates bcr/abl beiträgt. Es bietet sich damit als potentielles therapeutisches Target bei CML an [83].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Fortschritte in der Isolierung und Generierung von DC haben in den neunziger Jahren die Erforschung von DC in einer neuen Dimension möglich gemacht. Dennoch ist das Wissen über viele Moleküle, die eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von DC-Funktionen spielen, nach wie vor begrenzt. Von besonderem Interesse für aktuelle Untersuchungen sind daher Gene, die differentiell in DC exprimiert werden, in anderen Leukozytenpopulationen hingegen nicht zu finden sind. Mittels der zuvor beschriebenen cDNA-Subtraktion ist es möglich, genau solche Gene zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte die differentielle Expression des Proteins PTPRO/GLEPP 1 in DC untersucht werden. Dabei wird der Schwerpunkt zunächst auf die Expression in DC im Vergleich zu Monozyten, ihren Vorläuferzellen, gelegt. Da Monozyten und DC zahlreiche funktionelle wie phänotypische Übereinstimmungen besitzen, ist die differentielle Expression nur in dendritischen Zellen ein wichtiger Baustein der vorliegenden Untersuchung. Die Analyse sollte zum einen durch Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) auf mRNA-Ebene und zum anderen mittels Western Blot-Analyse auf Proteinebene erfolgen.

DC lassen sich in ihren Eigenschaften und Funktionen durch Stimulatoren wie TLR-Liganden, Inhibitoren wie IL-10 oder Medikamente wie Imatinib beeinflussen. Als weiterer Punkt interessiert daher die Regulierbarkeit von PTPRO durch solche Substanzen auf Ebene der Transkription und Translation.

Eine Untersuchung der Expression in verschiedenen Leukozyten- und DC-Populationen vervollständigt die Charakterisierung der PTP. Um dies zu erreichen, sollten diverse Subpopulationen isoliert und die PTPRO-Expression mittels Western Blot untersucht werden.

Eine funktionelle Analyse von PTPRO/GLEPP 1 kann in Zukunft einen weiteren Baustein für das Verständnis der DC und ihrer komplexen Funktion innerhalb des Immunsystems darstellen. Dies könnte langfristig das Verständnis über die Pathogenese von Erkrankungen verbessern und die gezielte Manipulation von DC für therapeutische Zwecke erleichtern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In Tabelle 2.1.1 sind alle für die Versuche verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 2.1.1: Geräte

Produkt	Hersteller
Agarosegel-Dokumentationsgerät UV-Reader Biometra Doc Analyzer	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Brutschrank NuAire US AutoFlow	NuAire Inc., Plymouth, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese-Apparatur	Appligene, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese-Apparatur Mini-Protean 3 Electrophoresis Sys- tem	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gefrierschrank -85 °C UF 300	Napco, Winchester, USA
Heizblock für 1,5 ml Reaktionsgefäße Unitek™ HBS-130	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Heiz- und Magnetrührer RCT Basic IKA®	VWR International GmbH, Bruchsal, Deutschland
Kühlschrank Kombination 4 °C, -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
<i>magnetic cell separator</i> MidiMACS und QuatroMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop Olympus Mo21	Olympus Optical GmbH, Hamburg, Deutschland

Produkt	Hersteller
Minishaker MS2	IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA
Mini Trans Blot Cell	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PCR-Gerät <i>Cycler</i> Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer Life Science, Wellesley, USA
Photometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	GE Healthcare, München, Deutschland
Pipettboy accu	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Schüttelbank KM-2 Akku	Edmund Bühler, GmbH, Hechingen, Deutschland
Schüttelbank Plymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterilbank Heraeus Hera Safe HS 18/2	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Stromversorgungsgerät Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen Heraus 1.0 R	Thermo Electron, Osterode, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5417R Multifuge 3 S-R	Eppendorff, Hamburg, Deutschland Thermo Electron, Osterode, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2.1.2 sind die für die Versuche verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 2.1.2: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Pipetten	
10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
20 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen ungestopft	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
200 µl	
1000 µl	
2 ml, Polystyrol, steril, gestopft	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
5 ml Polystyrol, steril, gestopft	Corning Inc., Corning, New York, USA
10 ml, Polystyrol, steril, gestopft	Corning Inc., Corning, New York, USA
25 ml, Polystyrol, steril, gestopft	Corning Inc., Corning, New York, USA
NUNC Cryo Tube™ Vialis 1,0 ml	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Falcon® Tissue Culture Flask	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
0,2 µm Vented Blue Plug Seal Cap, 250 ml, 75 cm ²	
PP-Test Tube Cellstar®, steril, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® Reaktionsgefäß 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Produkt	Hersteller
Polypropylenröhrchen Falcon [®] , 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
MACS-Säulen: MACS Column LS MACS Column CS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten 3 ml	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<i>Microtubes</i> 0,2 ml (PCR-Softstrips)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
96-Loch- Gewebekulturplatten Cellstar [®]	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Autoradiographiefilm	GE Healthcare, München, Deutschland
Einwegspritzen Injekt 5 ml, 10 ml, 20 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Whatman-Papier	BioRad Laboratories GmbH, München Deutschland
Reliant Gel System, 4% NuSieve 3:1 Plus Agarose	Lonze, Basel, Schweiz

2.1.3. Antikörper und Nukleotide

In Tabelle 2.1.3 sind die für die Untersuchungen verwendeten Antikörper und Nukleotide aufgeführt.

Tabelle 2.1.3: Antikörper

Produkt	Hersteller
PTPRO/ GLEPP 1 (Kaninchen polyklonal)	Purely Proteins Ltd., Cambridge, Großbritannien
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Santa Cruz, Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Santa Cruz, Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-GAPDH IgG	HyTest Ltd.; Turku, Finnland
Peptid PTPRO	Purely Proteins Ltd., Cambridge, Großbritannien
CD1c antibody anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD3 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus Anti-CD1a FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD14 FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD19 FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Produkt	Hersteller
Maus Anti-CD86 FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti- HLA-DR FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus IgG1 FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD1c (BDCA1)PE	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus Anti-BDCA2 PE	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus Anti-BDCA3 PE	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus Anti-CD3 PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD19 PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD56 PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD80 PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-CD83 PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Maus Anti-CD123 PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus Anti-HLA-DR PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus IgG1 PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Produkt	Hersteller
Primer für beta-2-Mikroglobulin (<i>Forward</i> Primer) 5' gggtttcacatccgacat 3'	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
(<i>Reverse</i> Primer) 5' gatgctgcttacatgtctcga 3'	
Primer für PTPRO (<i>Forward</i> Primer) 5' cacaatggagcaggaaggat 3'	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
(<i>Reverse</i> Primer) 5' cagtaagcagcctggtgtca 3'	

2.1.4 Chemikalien

In Tabelle 2.1.4 sind alle für die Versuche verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 2.1.4: Chemikalien

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Aprotinin (2 mg/ml)	Sigma, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München, Deutschland
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA 0,5M	Sigma, München, Deutschland

Produkt	Hersteller
FCS 10082	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll: Biocoll Separating Solution	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma, München, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Sigma, München, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Slim Fast Schokolade	Allpharm Vertriebs-GmbH, Messel, Deutschland
Imatinib (STI571)	Novartis Pharmaceuticals, Basel, Schweiz
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Produkt	Hersteller
Tween [®] 20	Sigma, München, Deutschland
GeneRuler [™] 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
Bench Mark [™] Prestained Protein Ladder	Life technologies, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Toll-like-Rezeptor-Liganden

In Tabelle 2.1.5 sind die für die Untersuchungen verwendeten TLR-Liganden aufgeführt.

Tabelle 2.1.5: Toll- like-Rezeptor-Liganden

Produkt	Hersteller
Pam ₃ Cys (TLR2-Ligand)	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Poly I:C (TLR3-Ligand)	Sigma, München, Deutschland
LPS (TLR4-Ligand)	Sigma, München, Deutschland
R848 (TLR7-Ligand)	InvivoGen, San Diego, USA

2.1.6 Kits

In Tabelle 2.1.6 sind die für die Untersuchungen verwendeten Kits aufgeführt.

Tabelle 2.1.6: Kits

Produkt	Hersteller
DNA-free [™] Kit	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

Produkt	Hersteller
ECL™ Western Blotting Detection Reagent Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
RNeasy Mini Kits	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Superscript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
MACS Blood Dendritic Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD1c (BDCA1) Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD303 (BDCA2) Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Amplitaq PCR-Set	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland

2.1.7 Medien und Zytokine

In Tabelle 2.1.7 sind alle für die Versuche verwendeten Medien und Zytokine aufgeführt.

Tabelle 2.1.7: Medien und Zytokine

Produkt	Hersteller
RPMI 1640 + Glutamax-I	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
X-VIVO 20	BioWhittaker™, Walkersville, USA
GM-CSF Leukine liquid Sargramostim	Berlex, Richmond, USA
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

IL-10	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
-------	--

2.1.8 Puffer und Stammlösungen

In Tabelle 2.1.8 sind alle für die Analysen verwendeten Puffer aufgeführt.

Tabelle 2.1.8: Puffer

Name	Zusammensetzung
RIPA-Lysepuffer	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS 2 mM EDTA 2 mg/ml Aprotinin 1 mM PMSF in PBS
NP40-Lysepuffer	0,05 M HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 1% Igepal CA-630 2 mM EDTA 10% Glycerin 2 mg/ml Aprotinin 1 mM PMSF
FACS-Puffer	0,5% FCS in PBS
MACS-Puffer	0,5% FCS 2 mM EDTA in PBS

Name	Zusammensetzung
DNA-Probenpuffer	0,15% Bromphenolblau
Agarosegelelektrophorese, 6-fach	0,15% Xylencyanol 1mM EDTA pH 8,0 30% Glycerin in H ₂ O
Laufpuffer (<i>Running buffer</i>) SDS- PAGE	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
Transferpuffer Western Blot	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS 20% Methanol
3-fach Probenpuffer (<i>Sample Buffer</i>) SDS-PAGE	0,18 M Tris-HCl pH 6,8 28% Glycerin 0,001% Bromphenolblau 6% SDS
TBS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl
0,5% TBST	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 0,5% Tween [®] -20
3% TBST	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 3% Tween [®] -20
TAE	40 mM Tris, 13 mM Essigsäure pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0

RP 10-Nährmedium:	Medium RPMI 1640 mit Glutamax-I, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin
-------------------	--

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation wurden aus *buffy coats* gesunder Spender, die von der Blutspendezentrale Tübingen bereitgestellt wurden, PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) gewonnen. Das Blut der *buffy coats* wurde mit PBS im Verhältnis 1:4 vermischt und langsam auf je 12 ml Ficoll in vier 50 ml-Cups geschichtet. Der Ansatz wurde bei 1800 rpm 18 min ohne Aktivierung der Bremse zentrifugiert. Danach befanden sich die mononukleären Zellen aufgrund ihrer Dichte oberhalb der Ficoll-Phase, Granulozyten und Erythrozyten unterhalb dieser. Mit Pasteurpipetten wurden die PBMC als weiße Zellschicht oberhalb des Ficoll abgenommen. Die Zellsuspension wurde zweimalig gewaschen, indem sie mit 25 ml PBS resuspendiert, 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt wurde.

Die Lebendzellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Für eine 1:10-Verdünnung wurden 10 μ l Zellsuspension mit 80 μ l Medium und 10 μ l Trypanblau eingesetzt. Nach Auszählung aller lebenden Zellen ergab sich die Gesamtzellzahl mit Hilfe der Formel:

Zellzahl \times Verdünnungsfaktor \times Gesamtvolumen $\times 10^4$ (Neubauersche Zahl) = Zellzahl/ml

Etwa 10^8 Zellen wurden mit 9 ml X-VIVO-Medium 2 Stunden zur Adhärenz der Monozyten bei 37°C inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden nach der Inkubation gründlich mit PBS abgewaschen.

2.2.2 Zellkultur dendritischer Zellen

Die Differenzierung von DC aus Monozyten wurde während siebentägiger Kultur bei 37°C und 5% CO₂ durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF erreicht. 10^8 Zellen wurden hierfür mit 10 ml RPMI-Medium in Kulturflaschen inkubiert und am Tag 0, 2, 4 und 6 20 ng/ml IL-4 und 100 ng/ml GM-CSF zugegeben. An diesen Tagen wurden die Proben ebenso mit Imatinib (1,76 μ g/ml) oder IL-10 (10 ng/ml) versetzt. Ab Tag 6 wurden vier verschiedene Ansätze mit den TLR-

Liganden Pam₃Cys (5 µg/ml), Poly I:C (50 µg/ml), LPS (100 ng/ml) und R848 (2 µg/ml) inkubiert. 2 µl/ml DMSO wurden einer Kulturflasche als Kontrolle ebenfalls an Tag 6 zugefügt, um einen Effekt des Lösungsmittels ausschließen zu können.

2.2.3 Magnetische Zellseparation (MACS)

Bei der magnetischen Zellseparation werden Antikörper verwendet, die an magnetische Mikropartikel gekoppelt sind. Damit wird eine Zellsuspension immunomagnetisch markiert. Nach der Bindung der markierten Antikörper an die gewünschten Zellen können diese mit einem Magneten aus einer Zellsuspension separiert werden. Nach der magnetischen Markierung werden die Zellen auf eine Trennsäule gegeben, die sich in einem Magnetfeld eines starken permanenten Magneten befindet. Die Säule dient als magnetischer Zellfilter: magnetisch markierte Zellen werden in der Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen durchfließen. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wird die Säule demagnetisiert und die retinierten Zellen können eluiert werden.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Grundlage einer FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine (gefärbte) Zellsuspension; die darin enthaltenen Zellen passieren einzeln einen fokussierten Laserstrahl und das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Die Quantität des gestreuten Lichts ist dabei abhängig von Volumen und Komplexität der Zelle. Die Vorwärts-Lichtstreuung ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und korreliert mit der Größe der Zellen. Die seitliche Lichtstreuung ist ein Maß für die Brechung des Lichts im 90°-Winkel, die von der Granularität bzw. dem Plasma/Kern-Verhältnis der Zelle beeinflusst wird. Es lassen sich so Granulozyten (großes Volumen, hohe Plasma/Kern-Relation, Granula) von Lymphozyten (geringes Volumen, hoher Kernanteil) und Monozyten (intermediäres Verhalten) unterscheiden. Zur Färbung der Zellen werden meist Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper eingesetzt, die spezifisch Strukturen auf den Zellen erkennen und markieren. Durch geeignete Wahl und Zusammensetzung der einzelnen Marker mit unterschiedlichen

Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich in einem Färbeansatz viele verschiedene Subpopulationen unterscheiden.

Für die FACS-Färbung wurde eine Suspension mit 1×10^5 Zellen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und 200 μ g Maus-IgG den Ansätzen zugegeben, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Zellen wurden mit einem PE- und einem FITC-konjugierten Antikörper inkubiert, die Antikörper wurden dabei entsprechend der jeweiligen Zielzelle gewählt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln folgte das Waschen der Proben mit 1 ml FACS-Puffer pro Röhrchen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation erneut in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Falls die Messung am nächsten Tag stattfand, wurden je 100 μ l FACS-Puffer und 100 μ l 2%ige Formalinlösung verwendet, um die Zellen zu fixieren. Die Zellen wurden innerhalb von 24 Stunden an einem Durchflusszytometer (FACS-Calibur, Beckton Dickinson) bezüglich der Expression ihrer gefärbten Oberflächenantigene analysiert. Die Auswertung erfolgte stets unter Verwendung der CellQuest™ Pro Software (BD Biosciences).

Die Analysen sind als *Dot Plots* dargestellt. Dies bedeutet, dass das Ergebnis der Durchflusszytometrie auf eine horizontale und eine vertikale Achse aufgetragen wird, wobei jeder Punkt (*dot*) einer Zelle entspricht. Die Population bei Färbung mit der Isotypkontrolle (Maus IgG1) lag *per definitionem* zu 99% im linken unteren Quadranten, so dass die Verlagerung der restlichen *Dots* in Relation dazu bestimmt werden konnte.

Die *Panels* für die verschiedenen untersuchten Zellen, können dem Ergebnisteil, Kapitel 3.1 und 3.4, entnommen werden.

2.2.5 RNA-Isolierung

Das Prinzip des RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH) beruht auf einer Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran, auf der die RNA durch mehrere Waschschr- itte gereinigt und anschließend eluiert wird. Die Zellen werden zunächst in einem stark denaturierenden, Guanidinisothiocyanat (GITC) enthaltenden Puffer ly- siert, durch den auch RNasen inaktiviert werden. Das visköse Lysat wird durch Zentrifugieren in den QIAshredder-Säulen homogenisiert, nach Zugabe von Ethanol zur Optimierung der Bindungsbedingungen werden die Proben auf die RNeasy Mini-Säule aufgetragen. Die Gesamt-RNA bindet an die Membran, während die übrigen Zellbestandteile ausgewaschen werden. Schließlich wird die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die einzelnen Schritte wurden ent- sprechend dem Protokoll für tierische Zellen im RNeasy Mini Handbuch durch- geführt. Zusätzlich wurde der optionale DNase-Verdau in der RNeasy Mini- Spinsäule mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets durchgeführt.

Der RNA-Gehalt und die Probenreinheit wurden mittels Spektrophotometrie (RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II) bestimmt. Hinsichtlich möglicher Kon- taminationen, die im UV-Bereich absorbieren (z. B. Proteine) ist das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm zu 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) ein Maß für die Reinheit der RNA. Der Zielbereich lag hierbei zwischen 1,8 und 2,0. Zur Kon- zentrationsbestimmung wurde die OD_{260} gemessen. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung spezi- fischer DNA-Abschnitte. Durch einen dreiteiligen Reaktionsablauf aus Denatu- rierung bei 95°C , Primer-Anlagerung (*annealing*) bei ca. 50°C und Elongation bei ca. 70°C wird die Zielsequenz des Matrizenstrangs während der PCR expo- nentiell vervielfältigt. Bei der RT-PCR wurde zunächst mittels reverser Trans- kription ein zu RNA komplementärer DNA-Strang (cDNA) synthetisiert und dann als Ausgangsmaterial für eine PCR verwendet.

Für die cDNA-Synthese wurde das Kit Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR verwendet. Ein Volumen, das 400 ng RNA enthielt, wurde in ein 200 µl Reaktionsgefäß transferiert und auf 10,75 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Pro *Tube* wurden 1 µl Oligo-DT-Primer und 1 µl 10mM dNTP-Mix zugegeben. Diese Ansätze wurden im Thermocycler 5 min bei 65°C erhitzt und dann unmittelbar auf Eis für 1 min gekühlt. Zu jeder Probe wurden 7,25 µl des in Tabelle 2.2.1 aufgeführten Mastermix pipettiert.

Tabelle 2.2.1: Zusammensetzung des cDNA-Mastermix

Volumen	Reagenz
4 µl	5x RT-Puffer + 25 mM MgCl
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	RNAse-Out
0,25 µl	Superscript-RT (50 <i>units</i> /µL)

Der cDNA-Syntheseschritt erfolgte im *cycler* bei 42°C für 50 min. Durch Inkubation bei 70°C für weitere 15 min wurde die Synthese beendet und die Proben bei 12°C abgekühlt. Die cDNA-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

Die so gewonnenen cDNA-Proben wurden für die Amplifizierung im *Thermocycler* eingesetzt. Der PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 50 µl enthielt 1 µl cDNA und 49 µl des in Tabelle 2.2.3 ersichtlichen Ansatzes. Neben den für PTPRO spezifischen Primern wurde stets auch eine Kontroll-PCR mit den Primern für den DNA-Abschnitt des β_2 -Mikroglobulin durchgeführt. Dieses wird als *house keeping gene* in allen Zellen in annähernd gleichem Ausmaß exprimiert und dient so als Kontrolle bezüglich der Effizienz der cDNA-Synthese und des Expressionsausmaßes des untersuchten Proteins.

Tabelle 2.2.2: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, β_2 -Mikroglobulin

Volumen	Reagenz
37,7 μ l	Ampuwa-Wasser (gereinigt)
5,0 μ l	10 \times Reaction Buffer + MgCl
1,0 μ l	100 mM dNTP
2,5 μ l	<i>forward</i> -Primer
2,5 μ l	<i>reverse</i> -Primer
0,3 μ l	Taq-Polymerase (5 <i>units</i> / μ l)

Tabelle 2.2.3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, PTPRO

Volumen	Reagenz
32,7 μ l	Ampuwa-Wasser (gereinigt)
5,0 μ l	10 \times Reaction Buffer + MgCl
1,0 μ l	100 mM dNTP
5,0 μ l	<i>forward</i> -Primer
5,0 μ l	<i>reverse</i> -Primer
0,3 μ l	Taq-Polymerase (5 <i>units</i> / μ l)

Nach Einsetzen der Reaktionsgefäße in den *Thermocycler* wurde die PCR mit den folgenden Basiseinstellungen durchgeführt:

Tabelle 2.2.4: PCR-Programm für β_2 -Mikroglobulin

Dauer	Temperatur	Schritt
5 min	94	Denaturierung
15 sec	94	} Je 25 Amplifikations- zyklen
30 sec	72	
30 sec	72	
5 min	72	Elongation
∞	15	Abkühlung

Tabelle 2.2.5: PCR-Programm für PTPRO

Dauer	Temperatur	Schritt
5 min	94	Denaturierung
15 sec	94	} Je 35 Amplifikations- zyklen
30 sec	72	
30 sec	72	
5 min	72	Elongation
∞	15	Abkühlung

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNA- oder RNA-Fragmente mittels eines Gels als Trägermedium entsprechend ihres Molekulargewichtes auftrennen. Die Methode beruht darauf, dass DNA aufgrund der negativen Ladung in einem Gleichspannungsfeld zur Anode wandert. Bei der Elektrophorese mit Agarosegelen wird die Trennung nach Molekülgröße durch die im Gel vorhandenen Poren erreicht, die wie ein Gitter wirken und deren Größe durch die Aga-

rosekonzentration bestimmt wird. Je höher bspw. die Agarosekonzentration, desto besser ist die Auftrennung für kleinere DNA-Fragmente.

Die elektrophoretische Auftrennung in dieser Arbeit wurde mit 4% NuSieve Fertiggelen der Firma Reliant Gel System durchgeführt. Das Gel wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer eingelegt und die Gel-taschen mit 6-fach-Probenpuffer beladen. Bei einer Spannung von 90 Volt wurde die Elektrophorese für 45 min durchgeführt. Zur Identifizierung der Länge des Fragments wurde zusätzlich ein geeigneter DNA-Molekulargewichtsstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch Interkalierung mit dem im Gel enthaltenen Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels UV-Reader Biometra Bio Doc Analyzer detektiert und dokumentiert.

2.2.8 Herstellung von Proteinlysaten

Um ein Proteinlysat von den isolierten und kultivierten Zellen zu erhalten, wurde die Zelllösung zentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in RIPA-Lysepuffer gelöst, wobei 1 ml Puffer für 5×10^7 Zellen verwendet wurde. Hierzu wurde direkt vor Gebrauch 5 µl Aprotinin (2 mg/ml), 50 µl PMSF (100mM) und 50 µl Natriumorthovanadat gegeben. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, mit einer Pipette zehnmal aufgezo-gen, um eine vollständige Lyse zu erreichen, und 10 min auf Eis inkubiert. Da-raufhin folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 20000 rpm und 4°C. Der wässrige Überstand wurde vom Pellet getrennt und für die spätere Konzentrati-onsanalyse aliquotiert. Das Lysat wurde bei -80°C eingefroren.

Für die Protein-Konzentrationsanalyse wurde ein BCA Assay verwendet. Je-weils 200 µl der BCA Reagenzlösung (Reagenz A + Reagenz B im Verhältnis 50:1) wurden pro 10 µl Probe eingesetzt. Um eine Standardkurve zu erstellen, wurden BCA-Proben in aufsteigender Konzentration verwendet (0,09 mg/ml, 0,18 mg/ml, 0,38 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml). Zur Bestimmung des Messfehlers durch Verwendung von Puffern wurden auch Proben von NP40 und RIPA-Puffer aufgetragen. Nach Inkubation der Ansätze für 30 min bei 37°C

und 5% CO₂ erfolgte die Messung der Extinktionswerte im ELISA-Reader und die Auswertung mit Hilfe des Programms Easy-Fit von SLT.

2.2.9 Auftrennung der Proteine durch *SDS-PAGE*

Das 1975 von O'Farrell entwickelte *SDS-PAGE*-Verfahren dient der Auftrennung komplexer Proteingemische in die enthaltenen Einzelproteine in einem Polyacrylamidgel. Nach der Trennung können die einzelnen Proteine analysiert werden. Es wird Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt, das sich mit den zu untersuchenden Proteinen komplex verbindet und dadurch die Eigenladung der Proteine überdeckt. So ist die Wanderstrecke der Proteine beim Anlegen elektrischer Spannung in der Gelmatrix lediglich abhängig von der Molekülgröße. Das Polyacrylamidgel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, die sich hinsichtlich pH-Wert, Vernetzungsgrad und Ionenstärke unterscheiden. Dadurch werden die Proteine im Sammelgel konzentriert, bevor sie sich im Trenngel separieren. Im durchgeführten Versuch wurde ein Tris-Glycin-Puffer-System eingesetzt, das eine optimale Auftrennung gewährleistet. Abbildung 2.2.1 veranschaulicht ein SDS-Gel nach der Auftrennung.

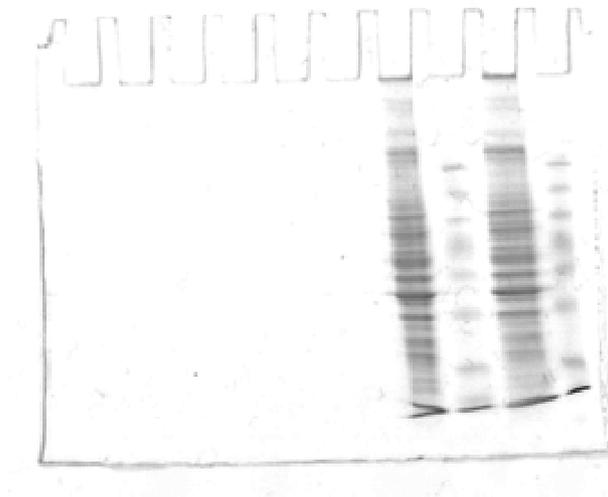


Abb. 2.2.1: SDS-Gel nach der Auftrennung

Das Trenngel wurde aus den in Tabelle 2.2.6 aufgeführten Substanzen in einer 30-minütigen Polymerisation hergestellt. Dieser Schritt wird durch

Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) initiiert.

Tabelle 2.2.6: Zusammensetzung des 15%-Polyacrylamid-Trenngels (für 2 Gele)

Volumen	Reagenz
5,6 ml	1M Tris pH 8,8
5 ml	30%Acrylamid
150 µl	10% SDS
4,2 ml	dest. Wasser
100 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Auf das Trenngel wurde das Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.2.7) aufgetragen, in das zur Aufnahme des Probenmaterials vor der Polymerisation mit einem Kamm Probenaschen eingeformt wurden.

Tabelle 2.2.7: Zusammensetzung des Sammelgels (für 2 Gele)

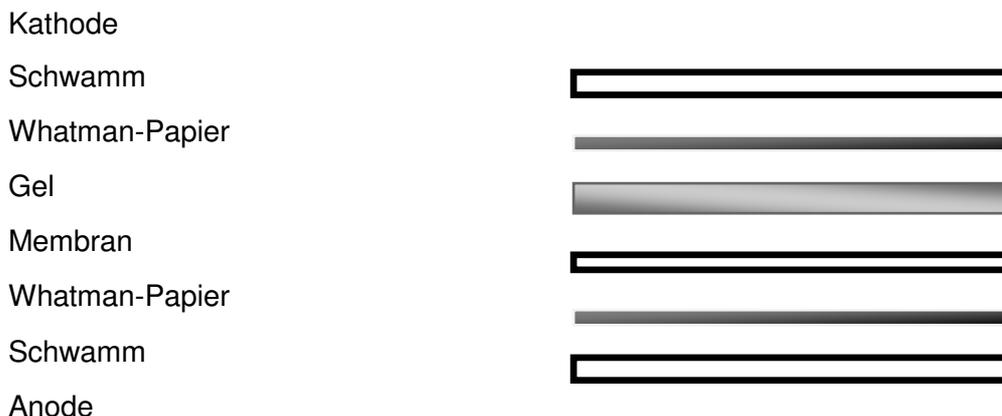
Volumen	Reagenz
2 ml	2M Tris pH 6,7
6ml	30%Acrylamid
100 µl	10% SDS
6 ml	dest. Wasser
100 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Die fertige Gelkammer wurde in die mit *Running Buffer* befüllte Mini-Protean 3-Elektrophoresekammer eingesetzt. Das Volumen der Zelllysate wurde anhand der zuvor bestimmten Proteinkonzentration so gewählt, dass 20 µg Protein pro Tasche eingesetzt wurden. Die Proben wurden mit RIPA-Lysepuffer auf 14 µl

aufgefüllt und 7 µl des 3-fach *Sample Buffer* / 30% 1M DTT zugegeben. DTT ist ein Reduktionsmittel, das hier verwendet wird, um Disulfidbrücken zu spalten. Nun wurde 4 Minuten bei 100°C denaturiert und das Gel mit den Proteinlysatsansätzen beladen. Als Molekulargewichtsmarker wurden 7 µl des Bench Mark™ Prestained Protein Ladder Markers in eine Tasche gefüllt. Falls eine Geltasche leer blieb, wurden 20 µl eines 2:1-Gemisches aus RIPA und *Sample Buffer*/DTT pro Tasche eingesetzt. Nun wurde die Elektrophorese bei 120 Volt gestartet und so lange fortgeführt, bis die Banden das untere Ende des Trenngels erreicht hatten.

2.2.10 Western Blot

Bei dieser Methode werden die in der *SDS-PAGE* aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der sie anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Zunächst wurde eine Nitrozellulosemembran zusammen mit zwei Whatman-Papieren und zwei Schwämmen in eine Schale mit Transferpuffer eingelegt. Anschließend wurde das Gel-Membran-Sandwich folgendermaßen zusammengesetzt:



Zwischen den einzelnen Schichten durften sich keine Luftblasen befinden, um einen homogenen Transfer zu gewährleisten. Die eigentliche Übertragung auf die Membran erfolgte bei konstant 250 mA unter Kühlung in der Apparatur Mini Trans Blot Cell. Nach einer Transferdauer von einer Stunde wurde die Memb-

ran aus der Blottingkammer entfernt und in TBS-Lösung gelegt, so dass sie nicht austrocknen konnte. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde sie eine Stunde in 4% Slim Fast-Lösung (Slim Fast in TBS/0,5% Tween gelöst) unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C zunächst mit dem Primärantikörper GLEPP 1/PTPRO inkubiert (Kaninchen polyklonal, Purely Proteins Ltd., Cambridge), der 1:200 mit 15 ml 2,5% Slim Fast-Lösung verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/0,5% Tween, folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:5000 verdünnt in 15 ml 2,5% Slim Fast-Lösung) für eine Stunde. Während dieser Inkubation erfolgte die Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Primär- und Sekundärantikörper. Nach gründlichem Waschen für 2 x 5 min in TBS/0,5% Tween, 5 min in TBS/3% Tween und 3 min in TBS/0,5% Tween wurde die Membran schließlich 2 x 5 min in PBS gewaschen, um Tweenreste zu entfernen.

Zur Detektion der gebundenen Zweitantikörper wurde das ECLTM-Plus-Detektion-Reagenz eingesetzt. In je 1 ml ECLTM-Lösung 1 und 1 ml ECL-Lösung 2 wurde die Membran für 1 min inkubiert, auf Klarsichtfolie überführt und darin vorsichtig eingeschlagen. In einer Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm aufgelegt, um die verschiedenen Banden darzustellen.

Das Prinzip des ECLTM-Reagenz besteht darin, dass die Antikörpergebundene Peroxidase das Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester oxidiert. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms mit der Membran nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob in allen Proben die aufgetragene Proteinmenge äquivalent war, wurde GAPDH-Antikörper (Maus Anti-Kaninchen GAPDH IgG, HyTest Ltd., Turku, Finnland) in einer Konzentration von 1:5000 (in 2,5% Slim Fast-Lösung gelöst) eingesetzt. Als Sekundär-Antikörper wurde in diesem Fall anti-Maus-Antikörper (1:2000 in 2,5% Slim Fast-Lösung) verwendet. Das Vorgehen glich im Übrigen den oben beschriebenen Schritten.

2.2.11 *Stripping* von Nitrozellulosemembranen

Sollte eine bereits im Western Blot eingesetzte Nitrozellulosemembran mehrfach benutzt werden, wurde ein sogenanntes *Stripping* durchgeführt. Diese Methode ermöglicht zwar weitere Nachweisreaktionen mit einem anderen Primärantikörper, es muss jedoch mit einem teilweisen Verlust Membran gebundener Proteine und einer Zunahme der unspezifischen Bindung (des Hintergrunds) gerechnet werden. Die Antikörper wurden durch dreimalige Inkubation für 10 min in *Stripping Buffer* mit 1,4 ml Mercaptoethanol entfernt. Zudem wurde die Membran 5 x 10 min in TBS 0,5% Tween gewaschen, um Mercaptoethanolreste von der Membran zu entfernen. Unspezifische Bindungen wurden bei Raumtemperatur mit Slim Fast-Lösung blockiert und die Membran nach dem in Kapitel 2.2.10 beschriebenen Vorgehen erneut mit Antikörpern behandelt.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung durch FACS-Analysen

Für den Nachweis der differentiellen Genexpression von PTPRO wurden Monozyten durch Adhärenz oder MACS-Separierung (siehe Methoden, Kapitel 2.2.3) gewonnen und jeweils mit 20 ng/ml IL-4 und 100 mg/ml GM-CSF für 7 Tage inkubiert, um DC zu generieren. Die Oberflächeneigenschaften der Zellpopulationen wurden mittels FACS-Analyse untersucht, um die Reinheit und den Phänotyp zu bestimmen. Für jede untersuchte Zellgruppe ist jeweils eine FACS-Analyse sowie das *Panel* zur Färbung mit FITC- und PE-Antikörpern angegeben. Die Analysen sind als *Dot Plots* dargestellt.

3.1.1 FACS-Analyse der MACS-isolierten Monozyten

Das in Tabelle 3.1 dargestellte *Panel* wurde für die Färbung mit FACS-Antikörpern eingesetzt, um den Phänotyp der Monozyten zu analysieren.

Tabelle 3.1: Phänotypisierung von MACS-isolierten Monozyten

Ansatz	FITC-Antikörper	Spezifität	PE-Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG1	Isotypkontrolle	Maus IgG1	Isotypkontrolle
2	Anti-CD19	B- Zellen	Anti-CD3	T-Zellen
3	Anti-CD14	Monozyten, Makrophagen	HLA-DR	MHC-Klasse-II

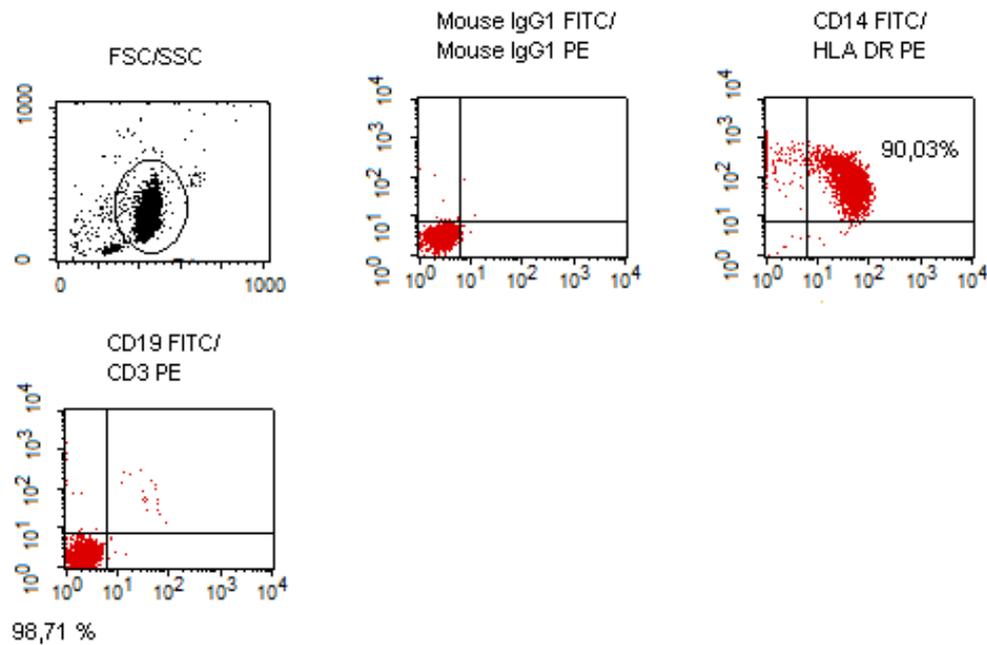


Abb. 3.1: FACS-Analyse von MACS-isolierten Monozyten. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Die FACS-Analyse in Abbildung 3.1 zeigt die Population der eingesetzten MACS-isolierten Monozyten. Der weit überwiegende Anteil ist Träger von CD14, einem für Monozyten spezifischen Oberflächenmolekül, und HLA-DR (spezifisch für MHC-II), jedoch nicht von CD3 (T-Lymphozyten-spezifisch) und CD19 (spezifisch für B-Lymphozyten). Die Analyse zeigt damit eine Reinheit der verwendeten Monozyten von über 90% mit nur geringfügiger Verunreinigung durch Lymphozyten und NK-Zellen.

3.1.2 FACS-Analyse der aus Monozyten gewonnenen dendritischen Zellen

Für die Färbung von aus Monozyten gewonnenen DC (moDC) wurde das in Tabelle 3.2 dargestellte *Panel* benutzt.

Tabelle 3.2: Phänotypisierung von moDC

Ansatz	FITC-Antikörper	Spezifität	PE-Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG1	Isotypkontrolle	Maus IgG1	Isotypkontrolle
2	Anti-CD1a	DC	Anti-CD83	Reife DC
3	Anti-CD86	Kostimulator- isches Molekül	Anti-CD80	Kostimulator- isches Molekül
4	Anti-CD14	Monozyten, Makrophagen	HLA-DR	MHC-Klasse-II

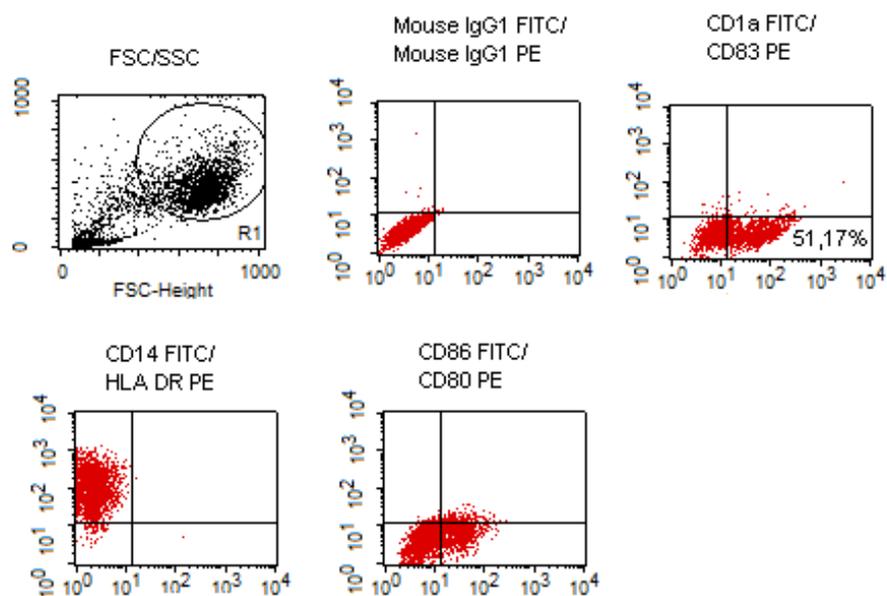


Abb. 3.2: FACS-Analyse von unreifen moDC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Wie in Abb. 3.2 dargestellt, exprimieren die *in vitro* aus Monozyten generierten DCs CD1a (typischer Marker unreifer DCs) zu 51,17%. Ein großer Teil ist im Hinblick auf die kostimulatorischen Moleküle CD86⁺, jedoch CD80⁻. Erwartungsgemäß sind DC HLA-DR positiv und im Gegensatz zu Monozyten negativ für CD14. In der Gesamtheit zeigt sich eine typische Population unreifer DC.

3.1.3 FACS-Analyse der DMSO-behandelten dendritischen Zellen

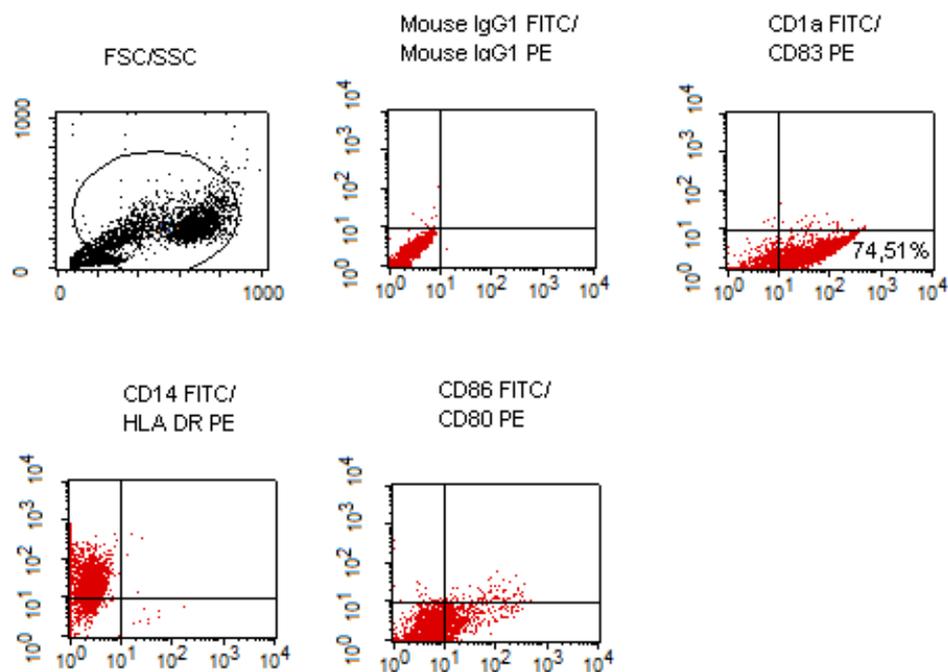


Abb. 3.3: FACS-Analyse von DMSO-behandelten, unreifen DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Da als Lösungsmittel von Imatinib und TLR-Liganden DMSO eingesetzt wurde, wurde eine Kontrollprobe mit DMSO zusätzlich untersucht, um eine unspezifische Regulation durch DMSO auszuschließen.

In Abbildung 3.3 ist der Phänotyp der unreifen DC dargestellt, die in Gegenwart von DMSO kultiviert wurden. Die verwendeten Zellen waren zu 74,51% positiv für CD1a. Die Zellen exprimieren fast ausnahmslos HLA-DR, doch kein CD14. Die DMSO-behandelten DC sind entweder CD80⁻/CD86⁻ oder CD80⁻/CD86⁺.

Insgesamt ist zu sehen, dass DMSO keinen Einfluss auf den Phänotyp der DC hat.

3.1.4 FACS-Analyse der LPS-stimulierten dendritischen Zellen

Zur Untersuchung der Regulation des Gens PTPRO wurden aus Monozyten generierte DC mit den TLR-Liganden Pam₃Cys (TLR2-Ligand), LPS (TLR4-Ligand), Poly I:C (TLR3-Ligand) und R848 (TLR7-Ligand) stimuliert.

In der durchflusszytometrischen Analyse der LPS-stimulierten, reifen DC (Abb. 3.4) zeigt sich ein für diese Population typischer Phänotyp. Es ist ersichtlich, dass praktisch alle DC typischerweise CD14⁻/HLA-DR⁺ sind. 44,75% der Zellen sind positiv für CD83 und 37,13% für CD83 und CD1a. Ebenso wird CD86/CD80 exprimiert.

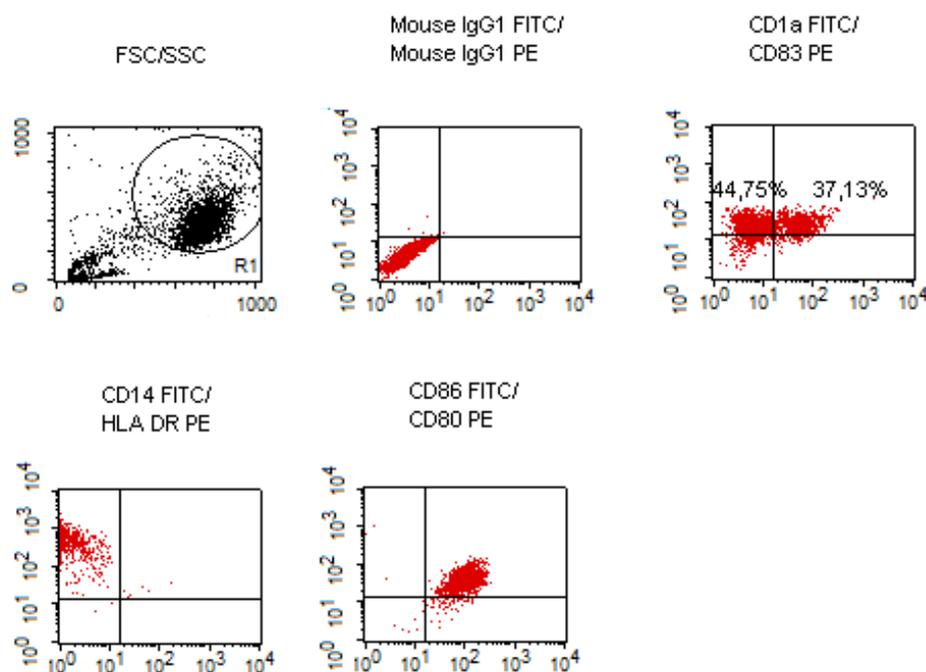


Abb. 3.4: FACS-Analyse von LPS-stimulierten, reifen DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

3.1.5 FACS-Analyse der mit Pam₃Cys behandelten dendritischen Zellen

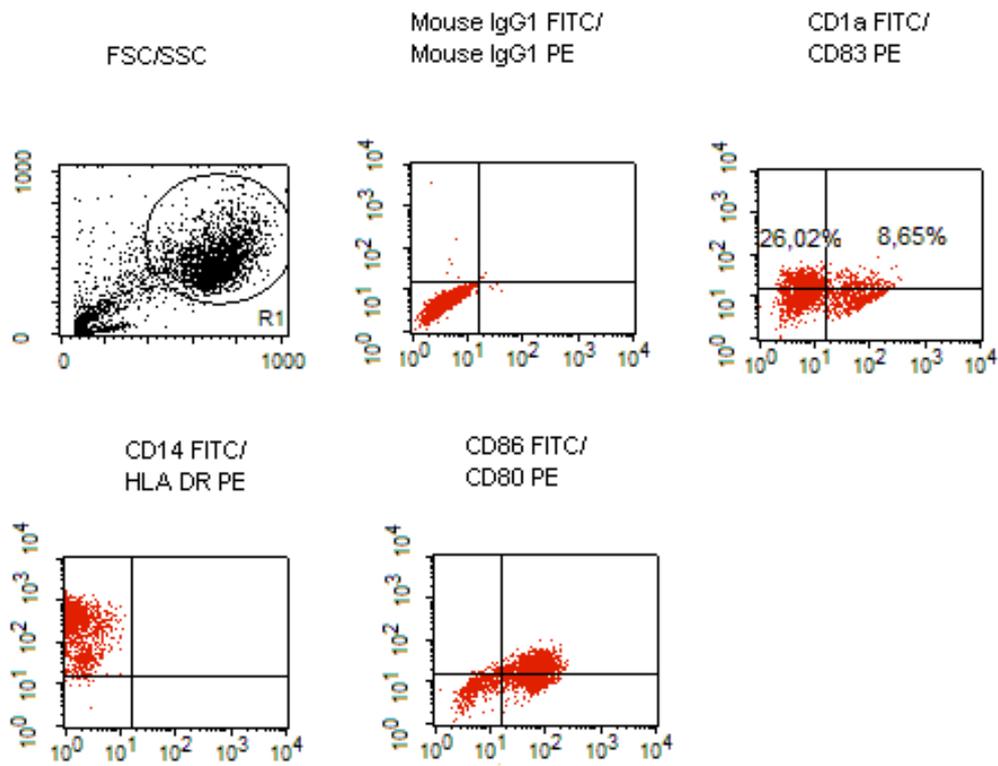


Abb. 3.5: FACS-Analyse von Pam₃Cys-behandelten DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Der Plot CD1a FITC-Antikörper gegen CD83 PE-Antikörper (Abbildung 3.5, oben rechts) zeigt, dass über 26% aller Zellen CD83 positiv sind und 8,65% für CD1a und CD83. Im Vergleich zu LPS-stimulierten DC tragen aber weniger Zellen das Reife-typische Molekül CD83. Praktisch alle Zellen exprimieren HLA-DR, jedoch kein CD14. Die Mehrheit dieser Population ist CD80⁺/CD86⁺. Zusammenfassend besitzen diese DC die Merkmale reifer DC.

3.1.6 FACS-Analyse der mit Poly I:C behandelten dendritischen Zellen

In Abbildung 3.6 wird der Phänotyp der mit Poly I:C kultivierten moDC gezeigt. Im Folgenden zeigen sich die Merkmale einer ausgeprägt reifen DC-Population: die Mehrheit der Zellen ist CD83⁺ (35,26%) oder CD1a⁺/CD83⁺ (57,02%). Die Zellen sind fast vollständig negativ für CD14 und positiv für HLA-DR. Es zeigt sich ein CD80⁺/CD86⁺ Phänotyp.

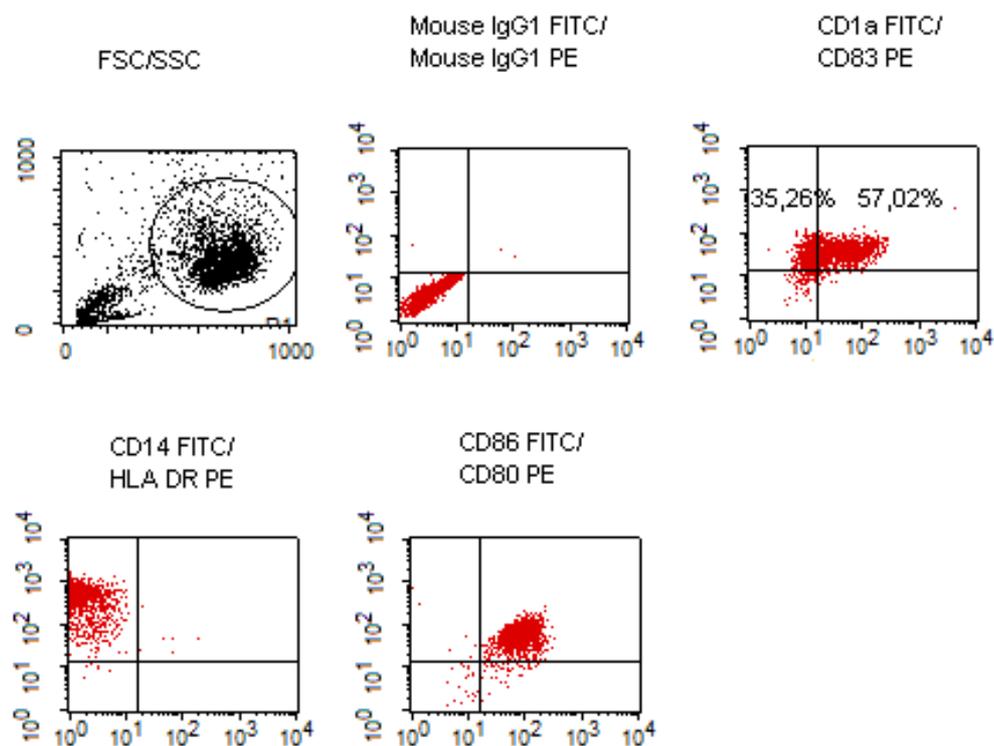


Abb. 3.6: FACS-Analyse von Poly I:C-behandelten DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

3.1.7 FACS-Analyse der mit R848 behandelten dendritischen Zellen

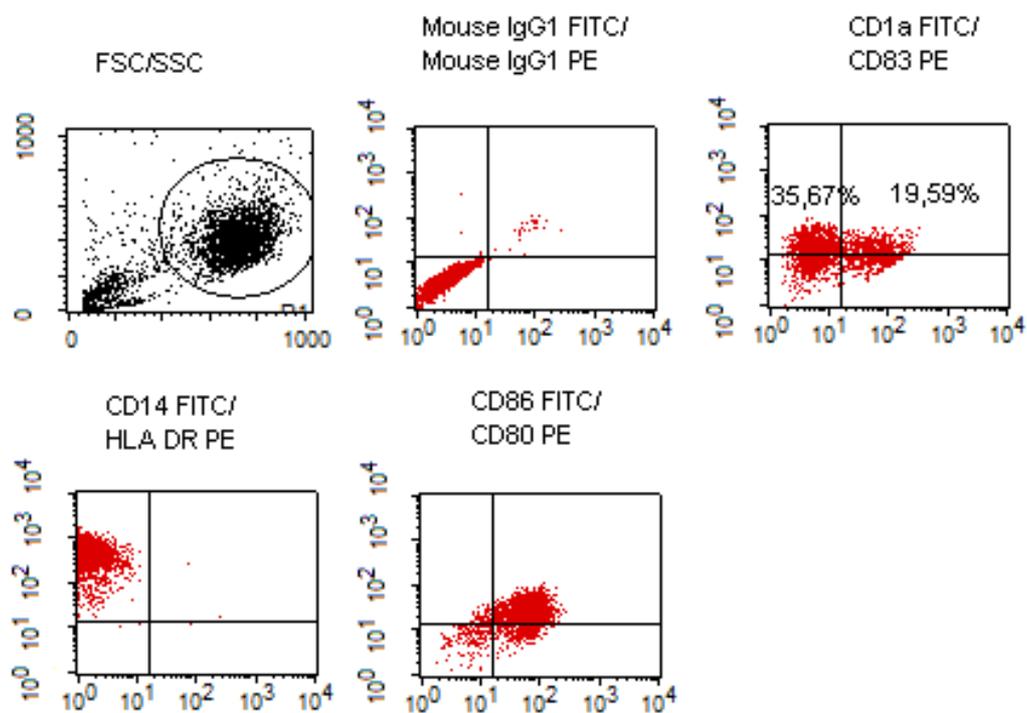


Abb. 3.7: FACS-Analyse von R848-behandelten DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Ähnlich den bisher gezeigten DC, die mit TLR-Liganden inkubiert wurden, zeigt sich in Abbildung 3.7 ein wesentlicher CD83⁺ (35,67%) bzw. CD1a⁺/CD83⁺ (19,59%) Anteil der Zellen. Die untersuchten Zellen sind überwiegend negativ für CD14 und positiv für HLA-DR, CD80 und CD86. So kann man von reifen DC sprechen, auch wenn dies nicht so ausgeprägt wie im Fall der Inkubation mit Poly I:C ist.

3.1.8 FACS-Analyse der mit Imatinib behandelten dendritischen Zellen

Die FACS-Analyse in Abbildung 3.8 zeigt die Population der mit Imatinib stimulierten, unreifen DC. Der Plot CD1a FITC-Antikörper gegen CD83 PE-Antikörper (Abbildung 3.5, oben rechts) zeigt, dass 20,62% aller Zellen positiv für CD1a sind. Die Zellen sind fast vollständig negativ für CD14 und positiv für HLA-DR. Die Mehrheit dieser Population ist CD80⁻/CD86⁺. Durch Imatinib entsteht also ein Phänotyp, der sich in reduzierter CD1a-Expression und vermehrter Expression von CD86 von normalen, unreifen moDC unterscheidet.

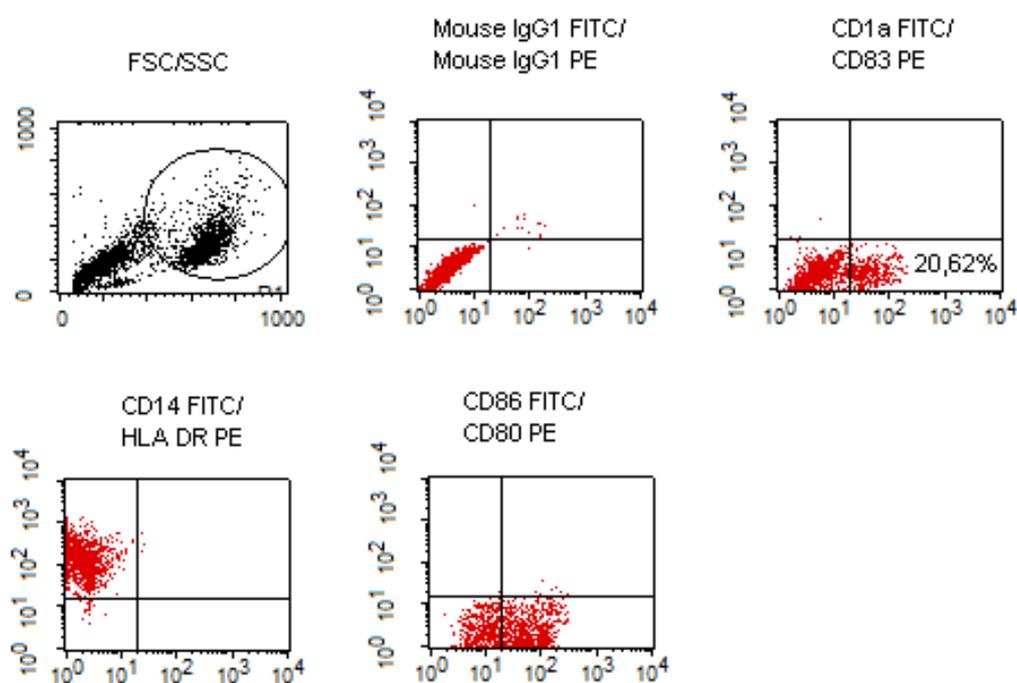


Abb. 3.8: FACS-Analyse von Imatinib-behandelten DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

3.1.9 FACS-Analyse der mit IL-10 behandelten dendritischen Zellen

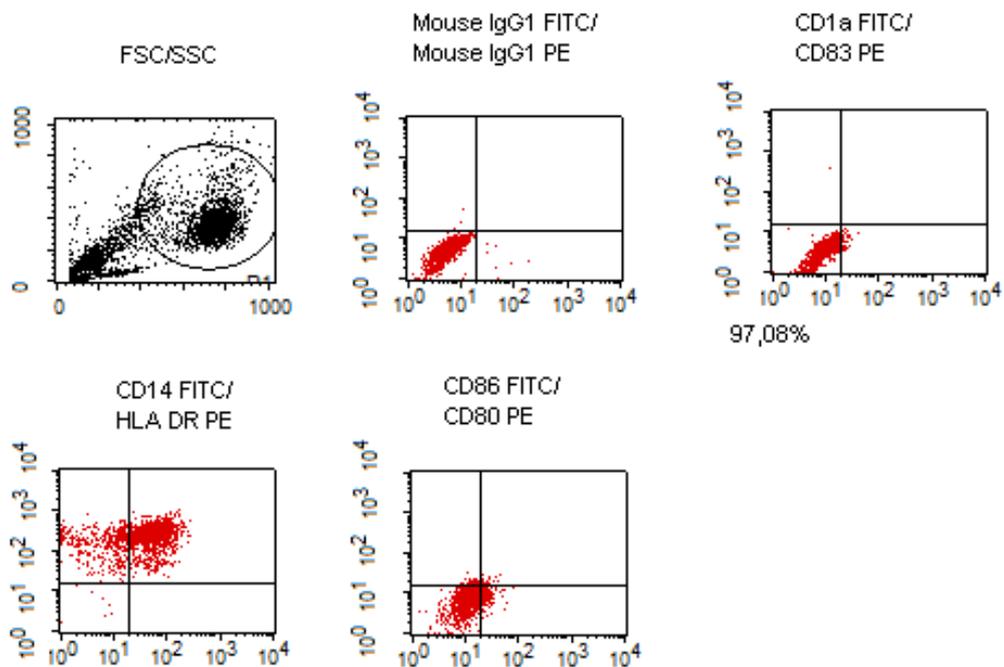


Abb. 3.9: FACS-Analyse von IL-10-behandelten DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Abbildung 3.9 zeigt die inhibitorische Wirkung von IL-10 auf sich differenzierende dendritische Zellen. Es fällt auf, dass über 97% der IL-10 stimulierten DC $CD1a^-/CD83^-$ sind, also einige für DC spezifische Marker kaum exprimiert werden. Für die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 sind die Zellen ebenfalls überwiegend negativ. Sie sind jedoch meist Träger von CD14 und HLA-DR. Es handelt sich hier um makrophagenähnliche Zellen.

3.2 Nachweis der differentiellen Expression von PTPRO in dendritischen Zellen

Aus den kultivierten Monozyten und DC wurden zum Nachweis differentieller Genexpression Gesamt-RNA isoliert und Proteinlysate hergestellt. Zur Überprüfung der Expression in den hier verwendeten Zelllinien wurde zunächst das Vorkommen von PTPRO mRNA mittels RT-PCR analysiert.

3.2.1 Nachweis der differentiellen Expression des Gens PTPRO/GLEPP 1 in dendritischen Zellen mittels RT-PCR und Western Blot

Um die Ergebnisse der cDNA-Subtraktion zu verifizieren, sollte die differentielle PTPRO-Expression in DC auf mRNA- und Proteinebene überprüft werden. Dafür wurde zunächst aus Monozyten, moDC und LPS behandelten, reifen DC RNA gewonnen. Die daraus hergestellte cDNA wurde mit Hilfe von *forward* und *reverse* Primern in 35 Zyklen amplifiziert. Abbildung 3.10 zeigt beispielhaft eine der drei durchgeführten RT-PCR-Untersuchungen.

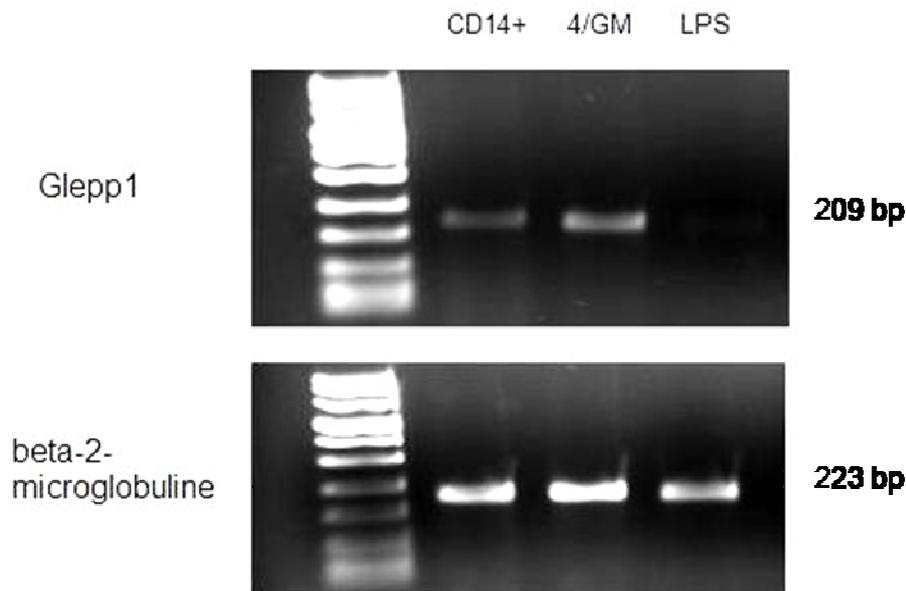


Abb. 3.10: Untersuchung der Expression von PTPRO. RT-PCR von Monozyten und moDC unter Verwendung des Primerpaares forward- und reverse-Primer. In die cDNA-Synthese wurden je Probe 400 ng RNA eingesetzt und anschließend je 1 μ l cDNA für die PCR verwendet. Spur 1: 1kb DNA Ladder Marker; Spur 2: Monozyten; Spur 3: unreife DC; Spur 4: reife DC. Kontrolle mit β 2-Mikroglobulin.

Für die unreifen DC zeigt sich ein starkes Signal, während bei den Monozyten eine schwächere Bande zu sehen ist. Bei DC, in denen durch LPS eine ausgeprägte Reifung induziert wurde, konnte kein bzw. nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden (s.a. Abb. 3.13). Es lässt sich ein Produkt nachweisen, das mit der errechneten Länge des PCR-Produkts von 209 bp übereinstimmt. Die Kontroll-PCR mit für β 2-Mikroglobulin spezifischen Primern ergab gleichmäßige Signale, dies bestätigt, dass gleiche Mengen an cDNA eingesetzt wurden.

Aus Monozyten und moDC wurden zusätzlich Proteinlysate erstellt und damit eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die wie in Kapitel 2.2.10 (Western Blot) erstellte Membran wurde über Nacht mit polyklonalem PTPRO-Primärantikörper in der Konzentration 1:200 inkubiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

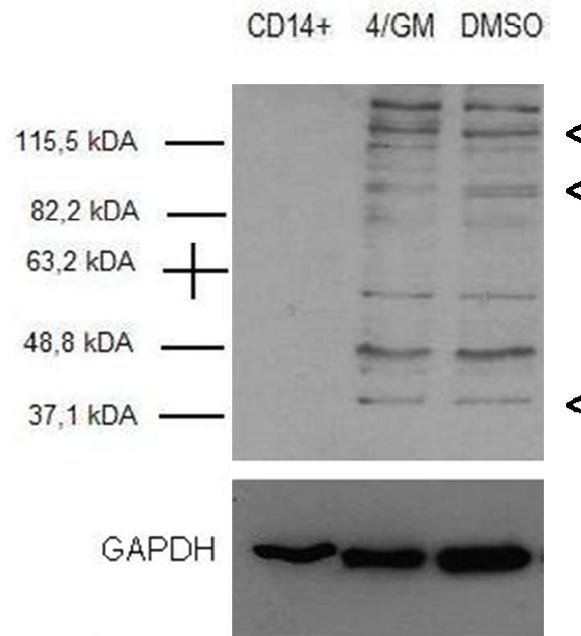


Abb. 3.11: Untersuchung der Expression von PTPRO. Western Blot von Monozyten und moDC. Spur 1: Monozyten; Spur 2: moDC, Spur 3: DMSO. Größenmarker: Prestained Protein Ladder Marker (nicht abgebildet). Kontrolle mit GAPDH. Pfeile (<) bezeichnen spezifische Banden.

Bei der Western Blot-Untersuchung zeigen sich zahlreiche Signale, die besonders bei ~ 43 kDa, ~ 47 kDa, ~ 60 kDa, ~ 90 kDa, ~ 130 kDa und ~ 140 kDa deutlich zu erkennen sind. Bei den mit IL-4 und GM-CSF generierten DC stellen sich diese Banden deutlich dar. Die dazu gehörigen Monozyten weisen keine Signale auf. Dieses Ergebnis bestätigt die selektive Expression von PTPRO in DC auf Proteinebene. Die GAPDH-Kontrolle zeigt die gleiche Beladung mit Protein, so dass das Ergebnis nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen ist.

3.2.2 Nachweis der Spezifität des verwendeten Antikörpers für das Protein PTPRO

Aufgrund der Vielzahl von Banden wurde zum Nachweis der Spezifität des eingesetzten polyklonalen PTPRO-Antikörpers eine Peptidinhibition durchgeführt. Proteinlysate aus Monozyten und moDC wurden dafür zweimal aufgetragen und nach dem Blotting in zwei Membranstücke geteilt. Eines wurde mit PTPRO-Primärantikörper, das andere mit Antikörperlösung inkubiert, die außer dem Primärantikörper das Immunisierungspeptid enthielt. Ein Immunisierungspeptid

ist das PTPRO-Peptid, mit dem das Kaninchen immunisiert wurde. Hiermit sollen die spezifischen Antikörperbindungsstellen blockiert werden.

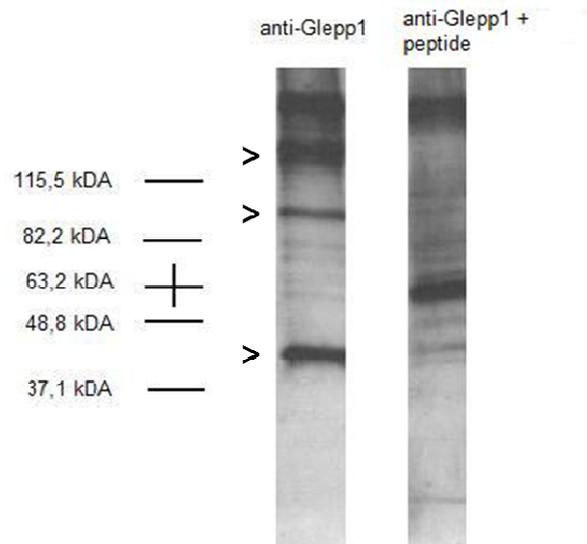


Abb. 3.12: Western Blot zum Nachweis der Antikörper-Spezifität. Spur 1: gegen PTPRO gerichteter Antikörper; Spur 2: mit Immunisationspeptid vorinkubiertes Antikörpergemisch. Größenmarker: Prestained Protein Ladder Marker (nicht abgebildet). Pfeile (>) bezeichnen spezifische Banden.

Für die aus Monozyten generierten DC zeigen sich in Abbildung 3.12 in Spur 1 zwei starke Signale bei ~ 43 kDa und ~ 130 kDa und ein schwächeres Signal bei ~ 90 kDa. Alle diese Banden verschwinden durch Inkubation mit dem Peptid blockierten Antikörper. Zusätzlich ist dort ein Signal bei ~ 60 kDa zu sehen. Die Banden bei ~ 43 kDa, ~ 90 kDa, ~ 130 kDa können daher als spezifisch angesehen werden.

3.3 Untersuchung der Regulierbarkeit der Genexpression von PTPRO durch Stimulatoren und Inhibitoren

DC lassen sich in ihrem Phänotyp und in ihrer Funktion durch TLR-Liganden, Zytokine oder Medikamente beeinflussen. Um die Expression von PTPRO genauer untersuchen zu können, wurden die DC mit TLR-Liganden, IL-10 oder Imatinib inkubiert.

Dazu wurden mittels Adhärenz oder MACS-Isolation gewonnene Monozyten jeweils mit 20 ng/ml IL-4 und 100 ng/ml GM-CSF für 7 Tage inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Substanzen zugegeben, die die Reifung zu DC fördern oder hemmen. Am sechsten Tag der Kultivierung wurden LPS (TLR4-Ligand), Pam₃Cys (TLR2-Ligand), Poly I:C (TLR3-Ligand) oder R848 (TLR7-Ligand) zugegeben. Als potentiell inhibitorische Substanzen wurden Imatinib und IL-10 von Beginn der Kultivierung an mit den Proben inkubiert.

Da als Lösungsmittel von Imatinib und TLR-Liganden DMSO eingesetzt wurde, wurde eine Kontrollprobe mit DMSO zusätzlich untersucht, um unspezifische Effekte durch DMSO auszuschließen.

Mit den so stimulierten Zellen wurden entweder RT-PCR-Analysen durchgeführt oder Zelllysate für Western Blot gewonnen. Die Ergebnisse repräsentieren drei verschiedene Experimente.

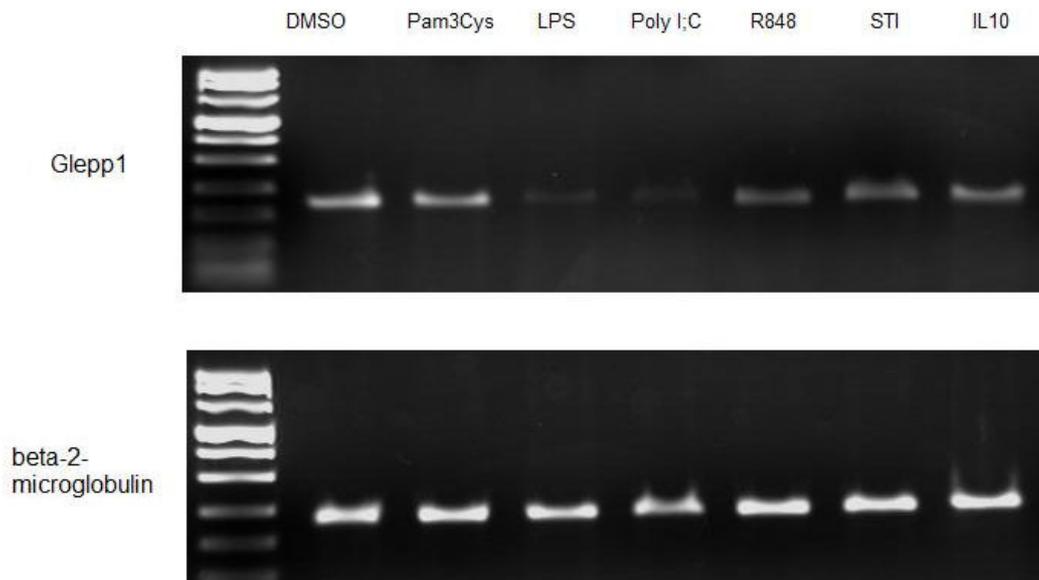


Abb. 3.13: RT-PCR: Einfluss von Stimuli auf die Expression von PTPRO.

Spur 1: 1kb DNA Ladder Marker, Spur 2: DC, DMSO-behandelt; Spur 3: DC, LPS-behandelt, Spur 4: DC, Pam₃Cys-behandelt, Spur 5: DC, Poly I:C-behandelt, Spur 6: DC, R848-behandelt; Spur 7: DC, Imatinib-behandelt; Spur 8: DC, IL-10-behandelt. Kontrolle mit β 2-Mikroglobulin.

Die RT-PCR (Abbildung 3.13) zeigt unterschiedlich starke Signale für die verschieden behandelten Zellen. Für die mit DMSO (Kontrollprobe) inkubierten, das heißt unreifen DC, zeigt sich eine deutliche Bande.

Das Signal bei den stimulierten DC stellt sich wie folgt dar: Bei den mit Pam₃Cys und R848 inkubierten DC lässt sich das Signal in gleicher Intensität wie bei nicht stimulierten DC feststellen. Durch Zugabe von LPS und Poly I:C ist die Expression stark unterdrückt, die angedeuteten Banden sind kaum zu erkennen. Durch diese beiden Substanzen ließ sich durchflusszytometrisch die ausgeprägteste Reifung induzieren.

Bei den mit inhibitorischen Substanzen behandelten DC zeigt sich eine leichte Abschwächung des beschriebenen Signals. Die β 2-Mikroglobulin-Kontrolle zeigt, dass gleiche Mengen RNA bzw. cDNA eingesetzt wurden.

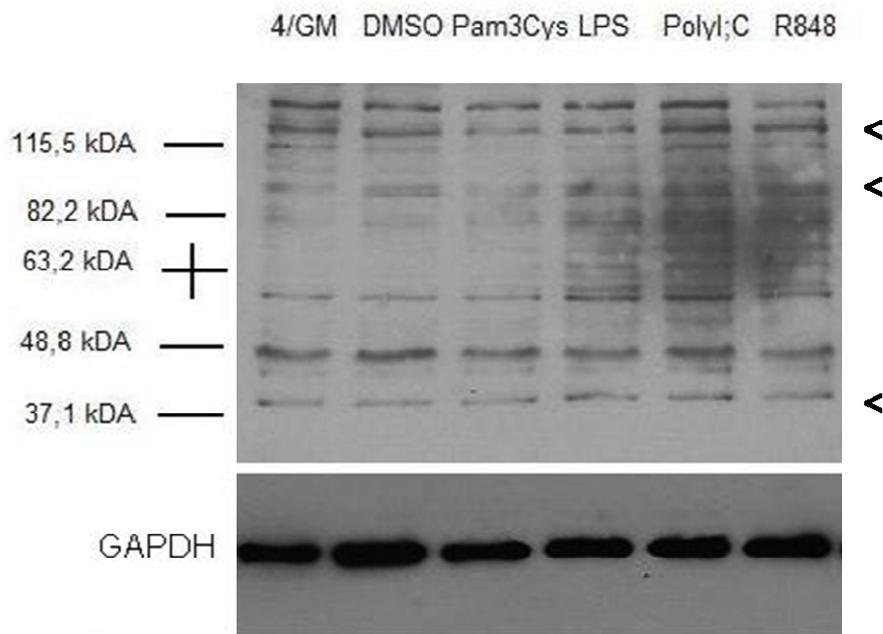


Abb. 3.14: Western Blot: Einfluss von Stimuli auf die Expression von PTPRO.

Spur 1: Monozyten, Spur 2: DC ohne Stimulans, Spur 3: DC, DMSO-behandelt, Spur 4: DC, Pam₃Cys-behandelt, Spur 5: DC, LPS-behandelt, Spur 6: DC, Poly I:C-behandelt, Spur 7: DC, R848-behandelt; Spur 8: DC, Imatinib-behandelt; Spur 9: DC, IL-10-behandelt. Kontrolle mit GAPDH. Pfeile (<) bezeichnen spezifische Banden.

Im Western Blot (Abb. 3.14) stellen sich bei den mit TLR-Liganden behandelten Zellen in etwa gleichmäßige Banden dar. Es lässt sich keine Überexpression oder Suppression durch die Stimulatoren zeigen. Die Suppression durch LPS und Poly I:C kann also auf Proteinebene nicht nachvollzogen werden.

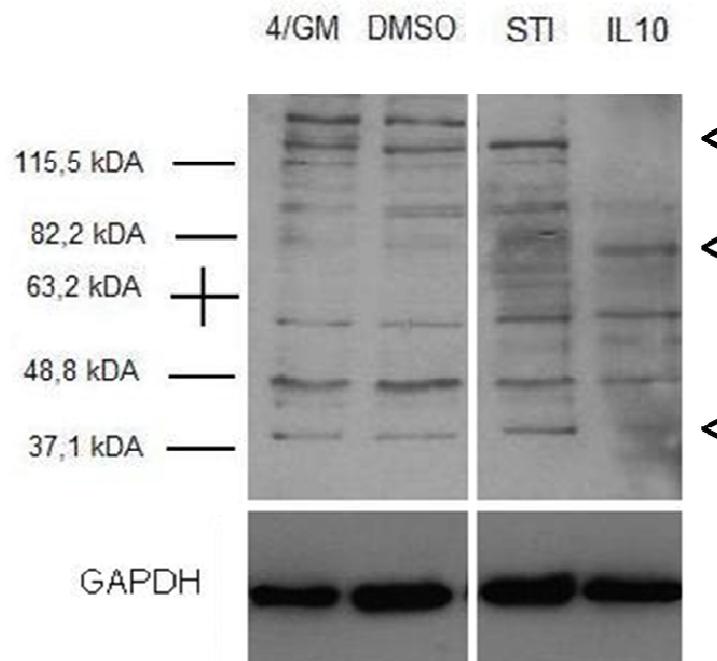


Abb. 3.15: Western Blot: Einfluss potentieller Inhibitoren auf die Expression von PTPRO. Spur 1: DC ohne Stimulans; Spur 2: DC, DMSO-behandelt; Spur 3: DC, Imatinib-behandelt; Spur 4: DC, IL-10-behandelt. Kontrolle mit GAPDH. Die Spuren stammen aus demselben Blot und werden zur besseren Übersicht nebeneinander dargestellt. Pfeile (<) bezeichnen spezifische Banden.

Entsprechend den Ergebnissen der RT-PCR zeigen sich die Banden durch IL-10-Behandlung deutlich abgeschwächt. Besonders betroffen sind die Signale bei ~ 43 kDa, ~ 130 kDa und ~ 140 kDa.

Durch Inkubation mit Imatinib zeigt sich das völlige Verschwinden einer Bande bei ~ 140 kDa. Die restlichen Signale stellen sich unverändert im Vergleich zu unbehandelten DC dar.

Eine unspezifische Regulation durch die zur Kontrolle durchgeführte DMSO-Behandlung ist nicht zu erkennen. Die Proteinbeladung stellt sich in der GAPDH-Kontrolle gleichmäßig dar. Die vier Spuren stammen aus demselben Blot, sie werden zur besseren Übersicht nebeneinander dargestellt.

3.4 Expression von PTPRO in verschiedenen Subpopulationen von Leukozyten

Nachdem die Expression in Monozyten und DC sowie die Regulation durch stimulierende und inhibitorische Substanzen untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob und in welcher Ausprägung PTPRO in anderen Leukozytenpopulationen exprimiert wird. Die Analyse wurde vervollständigt, indem verschiedene DC-Populationen des peripheren Blutes sowie B-Zellen und T-Zellen auf ihre Expression von PTPRO untersucht wurden.

Die aus magnetischer Zellsortierung gewonnenen Zellpopulationen wurden mittels FACS-Analyse phänotypisiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind den folgenden Kapiteln 3.4.1 bis 3.4.5 zu entnehmen.

3.4.1 FACS-Analyse der MACS-isolierten B-Lymphozyten

Das in Tabelle 3.3 dargestellte *Panel* wurde für die Färbung mit FACS-Antikörpern eingesetzt, um den Phänotyp der B-Lymphozyten zu analysieren.

Tabelle 3.3: Phänotypisierung von MACS-isolierten B-Lymphozyten

Ansatz	FITC-Antikörper	Spezifität	PE-Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG1	Isotypkontrolle	Maus IgG1	Isotypkontrolle
2	Anti-CD20	B-Lymphozyten	Anti-CD3	T-Lymphozyten
3	Anti-CD14	Monozyten, Makrophagen	Anti-CD56	NK-Zellen

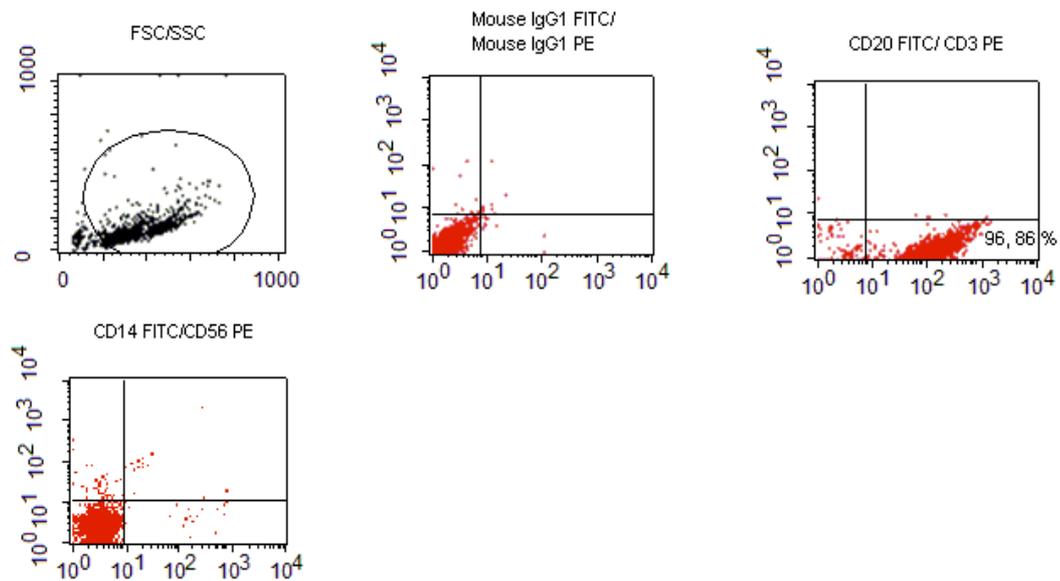


Abb. 3.16: FACS-Analyse von MACS-isolierten B-Lymphozyten. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt eine klare CD20⁺ (96,86%) / CD3⁻ / CD14⁻ / CD56⁻ Population von B-Lymphozyten, die annähernd frei von Verunreinigungen durch T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen ist.

3.4.2 FACS-Analyse der MACS-isolierten T-Lymphozyten

Das in Tabelle 3.4 dargestellte *Panel* wurde für die Färbung mit FACS-Antikörpern eingesetzt, um den Phänotyp der T-Lymphozyten zu analysieren.

Tabelle 3.4: Phänotypisierung von MACS-isolierten T-Lymphozyten

Ansatz	FITC-Antikörper	Spezifität	PE-Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG1	Isotypkontrolle	Maus IgG1	Isotypkontrolle
2	Anti-CD3	T-Lymphozyten	Anti-CD19	B-Lymphozyten
3	Anti-CD14	Monozyten, Makrophagen	Anti-CD56	NK-Zellen

Die FACS-Analyse in Abbildung 3.17 zeigt die Population der MACS-isolierten T-Lymphozyten. Der Plot CD3 FITC-Antikörper gegen CD19 PE-Antikörper (Abbildung 3.17, oben rechts) zeigt, dass 98,23% aller Zellen positiv für CD3 sind. Die Zellen sind fast vollständig negativ für CD14 und CD56. Zusammenfassend ist ein für T-Lymphozyten typischer Phänotyp zu sehen.

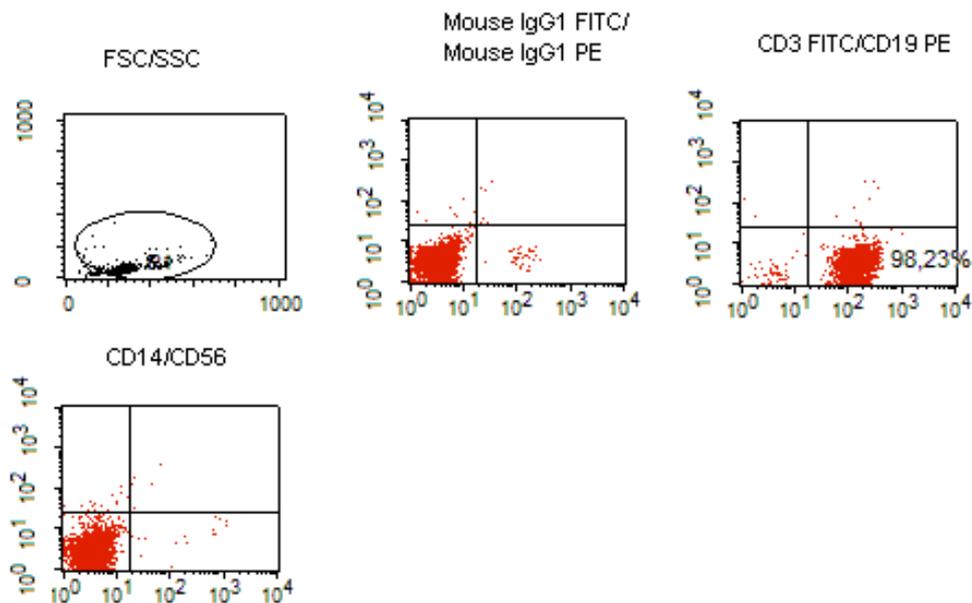


Abb. 3.17: FACS-Analyse von MACS-isolierten T-Lymphozyten. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

3.4.3 FACS-Analyse der dendritischen Zellen des peripheren Blutes

DC des peripheren Blutes (*Blood DC*) exprimieren typische Oberflächenmarker, durch die sie sich von anderen Leukozyten unterscheiden. Das in Tabelle 3.5 dargestellte *Panel* wurde für die Färbung mit FACS-Antikörpern eingesetzt, um den Phänotyp der *Blood DC* zu analysieren.

Tabelle 3.5: Phänotypisierung von MACS-isolierten *Blood DC*

Ansatz	FITC-Antikörper	Spezifität	PE-Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG1	Isotypkontrolle	Maus IgG1	Isotypkontrolle
2	Anti-CD14/CD19	Monozyten, Makrophagen, B-Zellen	BDCA1(CD1c)/ BDCA2/ BDCA3	<i>Blood DC</i>

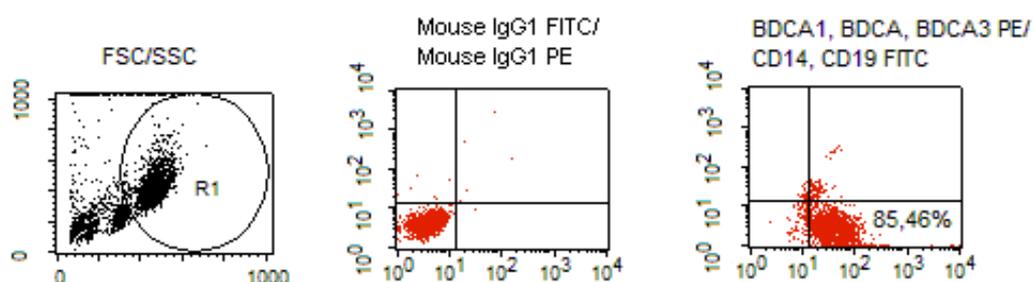


Abb. 3.18: FACS-Analyse von MACS-isolierten *Blood DC*. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

In Abbildung 3.18 ist der Phänotyp der DC des peripheren Blutes dargestellt. Der größte Anteil der Zellen (85,46%) zeigt sich positiv für BDCA1, BDCA2 oder BDCA3. Die Zellen sind fast vollständig negativ für CD14 oder CD19.

3.4.4 FACS-Analyse der myeloiden dendritischen Zellen

Das in Tabelle 3.6 dargestellte *Panel* wurde für die Färbung mit FACS-Antikörpern eingesetzt, um den Phänotyp der myeloiden (BDCA1⁺) DC zu analysieren.

Tabelle 3.6: Phänotypisierung von MACS-isolierten BDCA1⁺ *Blood* DC

Ansatz	FITC-Antikörper	Spezifität	PE-Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG1	Isotypkontrolle	Maus IgG1	Isotypkontrolle
2	Anti-CD19	B-Zellen	BDCA1(CD1c)	<i>Blood</i> DC

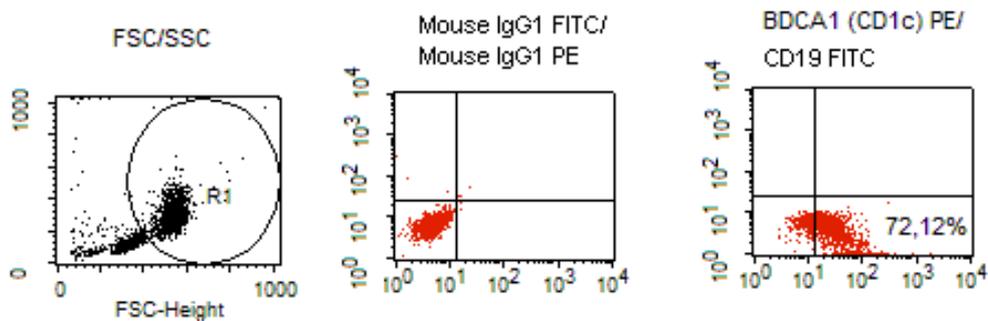


Abb. 3.19: FACS-Analyse von MACS-isolierten BDCA1⁺ *Blood* DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

In Abbildung 3.19 ist der Phänotyp der myeloiden (BDCA1⁺) *Blood* DC dargestellt. Der überwiegende Anteil der Zellen (72,12%) zeigt sich positiv für BDCA1 und negativ für CD19.

3.4.5 FACS-Analyse der plasmazytoiden dendritischen Zellen

Das in Tabelle 3.7 dargestellte *Panel* wurde für die Färbung mit FACS-Antikörpern eingesetzt, um den Phänotyp der plasmazytoiden (BDCA2⁺) DC zu analysieren.

Tabelle 3.7: Phänotypisierung von MACS-isolierten BDCA2⁺ *Blood* DC

Ansatz	FITC-Antikörper	Spezifität	PE-Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG1	Isotypkontrolle	Maus IgG1	Isotypkontrolle
2	HLA-DR	MHC-Klasse-II	BDCA2	<i>Blood</i> DC
3	HLA-DR	MHC-Klasse-II	CD123	<i>Blood</i> DC

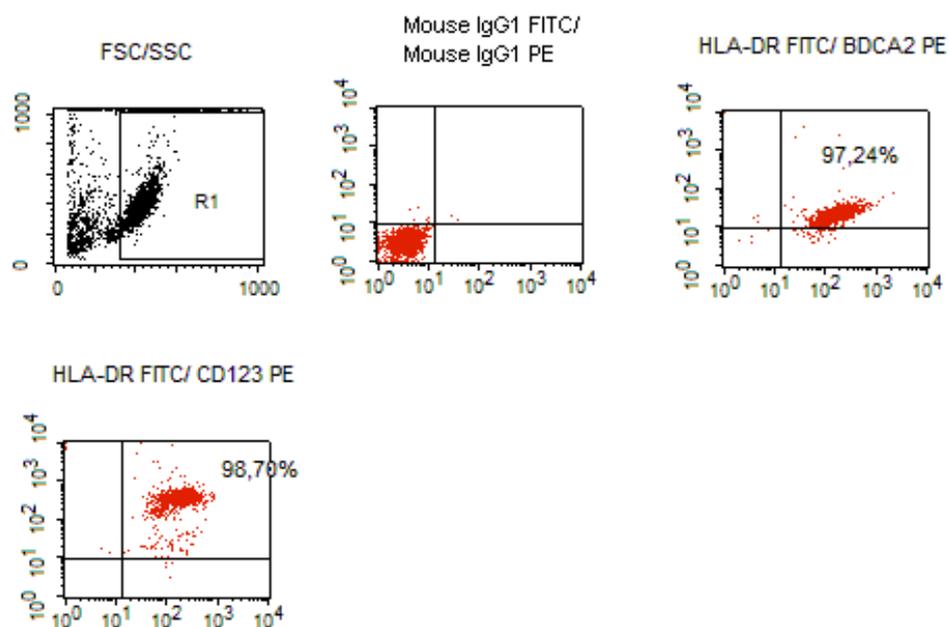


Abb. 3.20: FACS-Analyse von MACS-isolierten BDCA2⁺ *Blood* DC. Obere Reihe, Mitte: Isotypkontrolle. Die Plotüberschriften geben die X/Y-Achse wieder. Der prozentuale Anteil an Zellen ist teilweise in den entsprechenden Quadranten angegeben.

Der Phänotyp in Abbildung 3.20 spricht für eine äußerst reine Population BDCA2-positiver DC, da 97,24% den spezifischen Oberflächenmarker exprimieren. Desweiteren sind fast alle Zellen positiv für CD123 (98,70%).

3.4.6 Untersuchung der Expression von PTPRO in verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen mittels Western Blot

Die Expression von PTPRO wurde auf Proteinebene mittels Western Blot-Analysen untersucht. Dazu wurden aus den durch magnetische Zellsortierung gewonnenen Zellpopulationen Proteinlysate hergestellt, von denen je 20 µg pro Spur eingesetzt wurden. Die Leukozyten stammen von *buffy coats* verschiedener Spender.

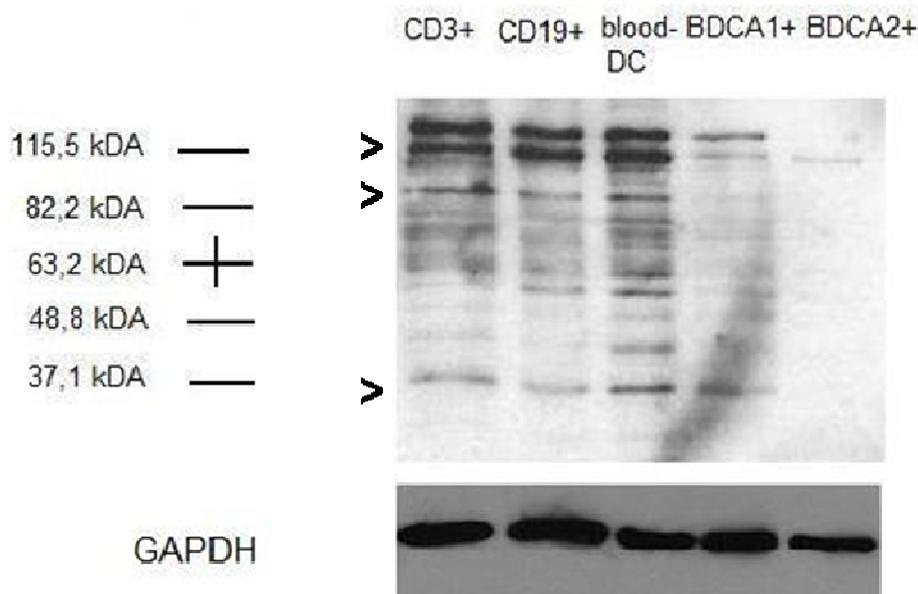


Abb. 3.21: Western Blot: Expression von PTPRO in verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen. Spur 1: T-Lymphozyten, Spur 2: B-Lymphozyten, Spur 3: *Blood* DC, Spur 4: BDCA1⁺ DC, Spur 5: BDCA2⁺ DC. Größenmarker: Prestained Protein Ladder Marker (nicht abgebildet). Kontrolle mit GAPDH. Pfeile (>) bezeichnen spezifische Banden.

In dem in Abbildung 3.21 dargestellten Western Blot sind kräftige Signale bei ~ 43 kDa, ~ 90 kDa und ~ 130 kDa für die T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und

Blood DC zu sehen. Auffallend ist, dass die Bande bei ~ 43 kDa bei den DC des peripheren Blutes (*Blood DC*) ausgeprägter ist als bei den Lymphozyten.

Drei entsprechende Banden zeigen sich in schwächerer Form bei den BDCA1⁺ DC. Für die BDCA2⁺ DC ist nur eine schwache Bande bei etwa 130 kDa zu erkennen, jedoch zeigt sich auch die Bande der GAPDH-Kontrolle etwas schwächer als die der BDCA1⁺ DC.

4 Diskussion

DC sind die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen, die eine einzigartige Rolle bei der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation spielen und in der Lage sind, primäre zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren [20], [35], [59].

Trotz ihrer zentralen Stellung innerhalb des Immunsystems sind sie nach wie vor nicht ausreichend charakterisiert. Ihr Funktionsspektrum ergibt sich aus der differentiellen Expression und Regulation spezifischer Gene in verschiedenen Reifestadien und Subpopulationen dieser heterogenen Zellgruppe. Daher gewinnt die Erforschung differentiell in DC exprimierter Gene zunehmend an Bedeutung. Mit Hilfe der cDNA-Subtraktion ist es neben DNA-*Microarrays* und *serial analysis of gene expression* (SAGE) möglich, solche noch nicht bekannten Gene zu isolieren [56], [6], [60], [43]. Die differentielle Expression wird mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse auf DNA- und Proteinebene überprüft. Um zu einem genaueren Verständnis der immunbiologischen DC-Wirkung zu gelangen, können die neu isolierten Proteine hinsichtlich ihrer Isoformen, Funktion und Interaktion untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die differentielle Expression des durch cDNA-Subtraktion identifizierten Proteins PTPRO in DC bestätigt und das Expressionsmuster näher charakterisiert.

4.1 Nachweis der differentiellen Expression von PTPRO in dendritischen Zellen

PTPRO wurde durch cDNA-Subtraktion als differentiell in DC im Vergleich zu Monozyten identifiziert. Zunächst sollte dieses Ergebnis mittels RT-PCR und Western Blot auf seine Richtigkeit überprüft werden.

In der RT-PCR (siehe Abb. 3.10) ließ sich ein spezifisches Signal nachweisen. Es zeigte sich eine schwächere PTPRO-Expression in Monozyten als in DC. Im Western Blot wurde beobachtet, dass PTPRO von DC exprimiert wird, nicht jedoch von Monozyten, aus denen sie hervorgegangen sind. (Abb. 3.11). Es

kann festgestellt werden, dass PTPRO differentiell in DC im Vergleich zu Monozyten exprimiert wird, da kein Protein in Monozyten nachzuweisen war.

Die Diskrepanz der Ergebnisse kann darauf zurückzuführen sein, dass in Monozyten die Genexpression posttranskriptional reguliert wird. Während die Transkription hier noch auf niedrigem Niveau stattfindet, wird kein oder nur in sehr geringem Maße Protein synthetisiert. Die Ursache dafür kann auf verschiedenen genregulatorischen Stufen zu finden sein. Dafür kommen geringe mRNA-Stabilität, fehlende Initiation der Translation, Inhibition der Translation durch Phosphorylierung eines Serinrestes von eIF2 bzw. durch miRNAs oder besonders schnelle Degradation des Proteins in Betracht.

Auffallend ist die Vielzahl von Signalen im Western Blot. Die in der Literatur beschriebenen Translationsprodukte von 43 kDa, 47 kDa, 135 kDa und 138 kDa sind zu erkennen. Außerdem stellen sich deutliche Signale bei ~ 60 kDa, ~ 80 kDa, ~ 90 kDa und ~ 115 kDa dar. Es stellt sich die Frage, wodurch diese zusätzlichen Signale entstanden sein könnten. Grundsätzlich kann man zwischen Artefakten und reellen Banden als Ursache unterscheiden. Zu den Artefakten gehören unspezifische Bindungen und Kreuzreaktivität.

Zum einen muss bei polyklonalen Antikörpern wie dem hier verwendeten im Allgemeinen damit gerechnet werden, dass neben den gesuchten Antigenen auch andere Epitope gebunden werden. Besonders wenn die Proteine in hoher Konzentration vorliegen, kann es so zu unspezifischen Bindungen kommen.

Eine andere mögliche Ursache ist die Kreuzreaktivität durch Bindung an ein sehr ähnliches Epitop. Zwar ist für den eingesetzten Antikörper keine Kreuzreaktivität mit anderen PTP wie SAP1, PTPgamma, PTPbeta, DEP1, PTPkappa, PCPTP1 oder LAR bekannt [129]. Trotzdem kann eine Kreuzreaktivität mit einem noch unbekanntem Reaktanden nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Weiterhin kommen reelle Banden als Ursache in Betracht. Die Signale könnten einerseits durch posttranslationale Modifikation, beispielsweise durch Unterschiede in der Glykosylierung oder Phosphorylierung, entstehen. Dadurch än-

dert sich das Molekulargewicht des Proteins und es entstehen veränderte Banden im Western Blot.

Eines oder mehrere der Signale könnten andererseits proteolytische Produkte darstellen. Dazu passend beschreiben Taniguchi *et al.* zwei wahrscheinlich proteolytische Produkte von PTPRO in Megakaryozyten. Eines davon besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa entsprechend einer der hier gezeigten Banden [118]. Mögliche Spaltstellen sind beispielsweise dibasische Reste direkt nach der Transmembrandomäne [91] und - wie es häufig bei R-PTP vorkommt - innerhalb der vierten Fibronectin-III-Domäne [40], [118].

Die Vielzahl der Banden lässt sich zusätzlich dadurch erklären, dass in DC zellspezifisch weitere Spleißvarianten von PTPRO exprimiert werden. Alternatives Spleißen ist bei R-PTP interessanterweise ein häufiges Phänomen. Es ergeben sich dadurch extra- oder intrazelluläre Varianten [91]. Bei PTPRO selbst sind Spleißvarianten mit alternativen Startcodons bekannt [66], [91], [5]. Eine Untersuchung solcher Varianten ist für DC in der Literatur bisher nicht beschrieben. Bei Megakaryozyten zeigte eine Expressionsanalyse jedoch zellspezifische PTPRO-Proteine von 190 kDa bis 250 kDa [118], während in nahezu allen anderen beschriebenen Geweben nur eines oder mehrere der vier bekannten Isoformen exprimiert werden. Obwohl diese Hypothese schlüssig erscheint, bedarf es weiterer, auf diese Fragestellung ausgerichtete Untersuchungen, um die Signale sicher als Spleißvarianten zu identifizieren. Hierfür kommt die Suche nach weiteren Transkripten mit RT-PCR und Northern-Blotting sowie die Sequenzierung der fraglichen Banden der Western Blots infrage.

4.2 Spezifität des eingesetzten Antikörpers für PTPRO

Um erkennen zu können, welche der Signale spezifisch sind, wurde der verwendete Antikörper darauf überprüft, ob er das Protein spezifisch erkennt. Dafür wurde eine Peptidinhibition durchgeführt, bei der zunächst durch Inkubation des Erstantikörpers mit dem Immunisierungspeptid im Überschuss alle spezifischen Antikörperbindungsstellen abgedeckt werden. Die entstehenden Signale repräsentieren somit nur nicht-spezifische Bindungsstellen.

In dem Versuch kam es zum Verschwinden von drei Banden bei ~ 40 kDa, ~ 90 kDa und ~ 130 kDa. Entsprechend kann man darauf schließen, dass diese Banden PTPRO-spezifisch sind.

4.3 Expression von PTPRO in DC-Subpopulationen und Lymphozyten

Die Expression von PTPRO wurde in weiteren Versuchen in DC des peripheren Blutes, deren BDCA1⁺ und BDCA2⁺ Subpopulation und in Lymphozyten untersucht (siehe Abbildung 3.21).

Das Vorhandensein von PTPRO wurde neben DC auch in T-Lymphozyten und B-Lymphozyten gezeigt. Interessanterweise ist bekannt, dass Syk und Paxillin Substrate von PTPRO sind, die beide an der Zellbeweglichkeit von Leukozyten in Chemotaxis beteiligt sind, und dass PTPRO bei verschiedenen Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Regulation der Chemotaxis spielt [52]. Ob PTPRO in DC ebenso an der Zellmotilität beteiligt ist, könnte in zukünftigen Studien untersucht werden. Es wurde außerdem beobachtet, dass ein Signal, das wahrscheinlich der Isoform von 43 kDa Molekulargewicht entspricht, sich in DC stärker als in Lymphozyten darstellt. Die Bedeutung dieses Ergebnisses bleibt derzeit unklar.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass PTPRO in DC des peripheren Blutes exprimiert wird, jedoch weniger in BDCA1⁺ und BDCA2⁺ DC und dass ein Unterschied zwischen BDCA1⁺ und BDCA2⁺ Zellen besteht. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass PTPRO in der myeloiden BDCA1⁺ Zelllinie stärker exprimiert wird als in der plasmazytoiden BDCA2⁺ Zelllinie. Dies könnte mit der Funktion in den verschiedenen Subpopulationen zusammenhängen.

4.4 Einfluss stimulierender Substanzen auf die Expression von PTPRO

Zur Untersuchung der Regulation des Gens PTPRO wurden aus Monozyten generierte DC mit TLR-Liganden stimuliert. Es ist bekannt, dass in DC durch diese Substanzen eine Ausreifung induziert werden kann [117], [2], [79]. Polysaccharidfragmente wie Lipopolysaccharid (LPS) induzieren bei DC die Reifung über TLR4 [119]. Der natürliche Ligand des TLR3 ist dsRNA [27], [87], [117], doch synthetische dsRNAs wie Poly I:C sind ebenso in der Lage an TLR3 von DC zu binden.

Während für TLR7, TLR8 und TLR10 noch keine natürlich vorkommenden Liganden identifiziert werden konnten, sind für TLR7 zumindest synthetische Derivate der Imidazoquinolin-Gruppe als Liganden beschrieben, wie Imiquimod oder R848 (Resiquimod) [62], die im Tiermodell gute antivirale Eigenschaften zeigen [80].

Mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot-Analyse wurde das Expressionsmuster von DC nach Stimulation mit den genannten Substanzen analysiert (siehe Abb. 3.13 und 3.14). Es zeigte sich auf mRNA-Ebene eine verminderte Expression bei LPS und Poly I:C, durch die sich in der durchflusszytometrischen Analyse die stärkste Expression des Reife-typischen Moleküls CD83 darstellen ließ. Dies spricht für eine reduzierte Transkription bei DC nach ausgeprägter Reifung.

Auf Proteinebene kann diese Reduzierung nicht nachvollzogen werden, hier zeigt sich kein einheitliches Bild einer Überexpression oder Suppression unter dem Einfluss der einzelnen Stimulanzen.

Wiederholte Analysen lieferten stets dasselbe Ergebnis, so dass wahrscheinlich ein Mechanismus der Genregulation ursächlich ist. Die Versuche legen nahe, dass durch posttranskriptionale oder translationale Regulation der Effekt der reduzierten Transkription ausgeglichen wird. Dies könnte durch vermehrten Transport der mRNA ins Zytoplasma, hohe mRNA-Stabilität oder erhöhte Translationsrate mit Hilfe von Initiationsfaktoren bedingt sein.

Es stellt sich weiterhin die Frage, warum kein einheitliches Bild der Expressionsregulation durch TLR-Stimulation gewonnen werden konnte. Die im Vergleich zu nicht stimulierten DC unveränderten Signale können ein Hinweis darauf sein, dass die angewandten Verfahren nicht sensitiv genug sind, um eine Regulation von PTPRO zu erfassen. Ebenso könnte der Fall sein, dass das Protein PTPRO gleichermaßen in unreifen wie reifen DC exprimiert wird, woraus man ableiten könnte, dass die Funktion der PTP in allen Reifestufen der Population benötigt wird.

4.5 Einfluss inhibierender Substanzen auf die Expression von PTPRO

Als mögliche Inhibitoren der Zelldifferenzierung von Monozyten zu DC wurden IL-10 und Imatinib (STI571) eingesetzt.

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das die Funktion von DC inhibieren kann, indem es die Chemokinexpression verändert, die Zytokinproduktion vermindert und die Antigenpräsentation beeinflusst [11], [10], [33], [113]. In unreifen DC hemmt es die IL-12-Produktion und beeinträchtigt so die Fähigkeit der DC, die T-Zell-Aktivierung zu stimulieren. Das geschieht indirekt dadurch, dass MHC-Klasse-II und kostimulierende Moleküle bei DC, Monozyten und Makrophagen verringert werden [42], [85]. Zusätzlich können die inhibitorischen Moleküle ILT3 und ILT4 hochreguliert werden [77]. In DC, die aus peripheren Blutmonozyten generiert werden, ist die IL-6- und IL-15-Produktion durch Zugabe von IL-10 gehemmt und es wird ein Zustand der Antigen-spezifischen Anergie in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen induziert [112]. Die Inkubation mit IL-10 führt bei moDC zur Differenzierung in makrophagenähnliche Zellen, die vermehrt CD14 und weniger CD1a und CD1c exprimieren. Die DC sind weniger effizient darin, die Produktion von IFN- γ und IL-4 durch allogene T-Zellen zu stimulieren [33].

Die Effekte von IL-10 auf DC werden über verschiedene Signalkaskaden vermittelt, die im Einzelnen noch nicht bekannt sind. Bisher weiß man, dass IL-10 *nuclear factor κ B* (NF- κ B) blockiert und diese Inhibition durch verminderte

Phosphorylierung von NF- κ B-alpha und NF- κ B-epsilon charakterisiert ist [99], [23], [63].

Imatinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der Aktivität gegen Abl-Kinasen, c-kit und *platelet derived growth factor receptor* zeigt. Mit der Substanz können erfolgversprechende Resultate in der Therapie der t(9;22) bcr/abl-positiven CML, der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) erzielt werden. DC, die aus Monozyten generiert werden, zeigen durch die Stimulation mit Imatinib eine reduzierte Expression von CD1a, MHC-Klasse I und II und kostimulierenden Molekülen wie CD83, CD80 und CD40. Außerdem wird eine verminderte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen beobachtet, was zu einer eingeschränkten Fähigkeit führt, primäre T-Zell-Antworten auszulösen [15], [14], [16].

Mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse wurde der Einfluss der Substanzen auf PTPRO analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass PTPRO in den mit IL-10 behandelten DC etwas schwächer transkribiert wird als in unbehandelten DC. In den Western Blot-Analysen zeigt sich ebenfalls eine reduzierte Expression, die sich jedoch noch ausgeprägter darstellt (siehe Abb. 3.13 und 3.15). Die Translationsprodukte sind stark herunterreguliert, besonders die als spezifisch identifizierten Spleißprodukte bei ~ 40 kDa und ~ 130 kDa.

Interessant ist die Suppression, die sowohl in den durch IL-10-Behandlung generierten, makrophagenähnlichen Zellen als auch in Monozyten zu beobachten ist. Passend dazu konnten Pixley *et al.* zeigen, dass das Niveau der Expression von PTPRO in Makrophagen sehr niedrig ist [91].

Für Imatinib konnten wiederholte Western Blot-Analysen keinen supprimierenden Effekt auf die meisten PTPRO-Formen, jedoch interessanterweise das völlige Verschwinden nur einer einzigen Bande bei ~ 140 kDa zeigen. Da diese jedoch mittels Peptid inhibition als nicht-spezifisch ermittelt wurde, lassen sich daraus keine Schlüsse bezüglich des PTPRO-Expressionsmusters ziehen. Im Hinblick auf die zentrale immunregulierende Funktion der DC und die Rolle von PTPRO als Tumorsuppressor, der die Funktion von bcr/abl inaktivieren kann,

wäre es dennoch von Interesse die Identität dieser Bande in Zukunft weiter zu untersuchen [83].

5 Zusammenfassung

DC kommt als essentieller Bestandteil des Immunsystems eine herausragende Rolle bei der Induktion und Erhaltung primärer Immunantworten zu. Ihre funktionellen Möglichkeiten sind durch die Gesamtheit der von ihnen exprimierten Gene festgelegt. Mit Hilfe von subtraktiven cDNA-Analysen ist es möglich, Gene zu identifizieren, die in einer bestimmten Zellpopulation differentiell exprimiert werden. Durch die Identifizierung solcher Gene in DC können neue Einblicke in die komplexe Funktion dieser heterogenen Zellgruppe gewonnen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die differentielle Expression und das Expressionsmuster des membranständigen Proteins PTPRO/GLEPP 1 untersucht. PTPRO ist eine PTP, die eine wichtige Rolle für die Chemotaxis von Leukozyten spielt und bei zahlreichen Malignomen als Tumorsuppressor fungiert.

Mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse konnte zunächst die differentielle Expression von PTPRO in DC bestätigt werden. In Lymphozyten und DC-Subpopulationen wird PTPRO ebenfalls exprimiert, wenn auch in BDCA2⁺ Zellen weniger stark. Dies könnte auf eine sich entsprechende Funktion in Leukozyten hindeuten.

Die Stimulation mit TLR-Liganden führte auf Ebene der Transkription bei ausgeprägt reifen DC zu einer supprimierten PTPRO-Expression. Auf Proteinebene hatte die Stimulation keinen Einfluss auf die Stärke der Expression. Die Versuche legen nahe, dass durch posttranskriptionale oder translationale Regulation der Effekt der reduzierten Transkription ausgeglichen wird. Es ist möglich, dass das Protein PTPRO gleichermaßen in unreifen wie reifen DC exprimiert wird, woraus man ableiten könnte, dass die Funktion der PTP in allen Reifestufen der Population benötigt wird.

Die Inkubation mit IL-10 konnte auf mRNA- sowie auf Proteinebene, ganz im Sinne der bekannten inhibierenden Wirkung von IL-10 auf DC, eine reduzierte Expression von PTPRO induzieren. Die Translationsprodukte sind stark

herunterreguliert, besonders die Spleißprodukte von ~ 40 kDa und ~ 130 kDa. Diese Resultate legen nahe, dass PTPRO eine für DC spezifische Funktion übernimmt.

Durch Imatinib-Behandlung kam es zu dem völligen Verschwinden einer Bande bei ~ 140 kDa. Die übrigen Signale zeigten sich unverändert zu unbehandelten DC. Im Hinblick auf die zentrale immunregulierende Funktion der DC und die Rolle von PTPRO als Tumorsuppressor, der die Funktion von bcr/abl inaktivieren kann, wäre es von Interesse die Ursachen dieser Beobachtung weiter zu untersuchen [83].

In Zukunft könnten weiterführende Studien zu PTPRO zu einem besseren Verständnis der funktionellen Bedeutung von PTPRO und damit auch der molekularen Mechanismen von DC führen.

Literaturverzeichnis

- [1] Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(22):12889-12894.
- [2] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406(6797):782-787.
- [3] Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17:593-623.
- [4] Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, Pulendran B. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct T_H responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-fos. *J Immunol*. 2003; 171(10):4984-4989.
- [5] Aguiar RC, Yakushijin Y, Kharbanda S, Tiwari S, Freeman GJ, Shipp MA. PTPROt: an alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest. *Blood*. 1999; 94(7):2403-2413.
- [6] Ahn JH, Lee Y, Jeon C, Lee SJ, Lee BH, Choi KD, Bae YS. Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. *Blood*. 2002; 100(5):1742-1754.
- [7] Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol*. 2001; 2(11):1010-1017.
- [8] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & CoKGaA, Weinheim, 2004.
- [9] Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR, Carbone FR. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*. 2006; 25(1):153-162.
- [10] Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the generation of dendritic cells from CD14+ blood monocytes, promotes the differentiation to mature macrophages and stimulates endocytosis of FITC-dextran. *Adv Exp Med Biol*. 1997; 417:323-327.
- [11] Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*. 1998; 28:359-369.

- [12] Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004; 117(6):699-711.
- [13] Amoui M, Baylink DJ, Tillman JB, William Lau KH. Expression of a structurally unique osteoclastic protein-tyrosine phosphatase is driven by an alternative intronic, cell type-specific promoter. *J Biol Chem*. 2003; 278(45):44273-44280.
- [14] Appel S, Balabanov S, Brümmendorf TH, Brossart P. Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. *Stem Cells*. 2005; 23(8):1082-1088.
- [15] Appel S, Boehmler AM, Grunebach F, Müller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brümmendorf TH, Brossart P. Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood*. 2004; 103(2):538-544.
- [16] Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brümmendorf TH, Weinschenk T, Grunebach F, Brossart P. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(5):1928-1940.
- [17] Asselin-Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med*. 2005; 202(4):461-465.
- [18] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:767-811.
- [19] Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell*. 2001; 106:271-274.
- [20] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392(6673):245-252.
- [21] Bariety J, Hill GS, Mandet C, Irinopoulou T, Jacquot C, Meyrier A, Bruneval P. Glomerular epithelial-mesenchymal transdifferentiation in pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18(9):1777-1784.
- [22] Berton G, Mócsai A, Lowell CA. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol*. 2005; 26(4):208-214.
- [23] Bhattacharyya S, Sen P, Wallet M, Long B, Baldwin AS Jr, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the pi3k/akt pathway and of ikappaB kinase activity. *Blood*. 2004; 104(4):1100-1109.
- [24] Biron CA. Initial and innate responses to viral infections—pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol*. 1999; 2(4):374-381.
-

- [25] Björck P, Flores-Romo L, Liu YL. Human interdigitating dendritic cells directly stimulate CD40-activated naive B cells. *Eur J Immunol.* 1997; 27(5):1266-1274.
- [26] Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class II products and peripheral CD8 + T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002; 196:1627-1638.
- [27] Botos I, Liu L, Wang Y, Segal DM, Davies DR. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1789(9-10):667-674.
- [28] Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood.* 2005; 106(7):2375-2381.
- [29] Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 1997; 185:541-550.
- [30] Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Möhle R, Kanz L, Brugger W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1998; 92:4238-4247.
- [31] Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol.* 2001; 29:1247-1255.
- [32] Brossart P, Zobywalski A, Grunebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res.* 2000; 60:4485-4492.
- [33] Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol.* 1997; 27:756-762C.
- [34] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. functional analysis. *Blood.* 1997; 90(4):1458-1470.
- [35] Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999; 5(8):919-923.
-

- [36] Chapius F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol.* 1997; 27:431-441.
- [37] Charba DS, Wiggins RC, Goyal M, Wharram BL, Wiggins JE, McCarthy ET, Ram Sharma, Sharma M, Savin VJ. Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type o (PTPRO) increase glomerular albumin permeability (p(alb)). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297(1):F138-F144.
- [38] Chen L, Juszczynski P, Takeyama K, Aguiar RC, Shipp MA. Protein tyrosine phosphatase receptor-type o truncated (PTPROt) regulates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular proliferation. *Blood.* 2006; 108(10):3428-3433.
- [39] Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature.* 1995; 378(6554):303-306.
- [40] Cheng J, Wu K, Armanini M, O'Rourke N, Dowbenko D, Lasky LA. A novel protein-tyrosine phosphatase related to the homotypically adhering kappa and mu receptors. *J Biol Chem.* 1997; 272(11):7264-7277.
- [41] de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity.* 1998; 9(3):325-336.
- [42] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991; 174(5):1209-1220.
- [43] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(12):6025-6030.
- [44] Edwards AD, Diebold SS, Slack EM, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Reis e Sousa C. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol.* 2003; 33(4):827-833.
- [45] Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4(12):1206-1212.
- [46] Flores-Romo L, Björck P, Duvert V, van Kooten C, Saeland S, Banchereau J. CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J Exp Med.* 1997; 185(2):341-349.
-

- [47] Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Münz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood*. 2003; 101(9):3520-3526.
- [48] François Fonteneau JF, Larsson M, Bhardwaj N. Interactions between dead cells and dendritic cells in the induction of antiviral CTL responses. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14(4):471-477.
- [49] Frearson JA, Alexandre DR. The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction. *Bioessays*. 1997; 19(5):417-427.
- [50] Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science*. 2002; 296(5573):1641-1642.
- [51] Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*. 2003; 4(4):355-360.
- [52] Gobert RP, van den Eijnden M, Szyndralewicz C, Jorand-Lebrun C, Swinnen D, Chen L, Gillieron C, Pixley F, Juillard P, Gerber P, Johnson-Léger C, Halazy S, Camps M, Bombrun A, Shipp M, Vitte PA, Ardisson V, Ferrandi C, Perrin D, Rommel C, Hooft van Huijsduijnen R. Glepp1/protein-tyrosine phosphatase phi inhibitors block chemotaxis in vitro and in vivo and improve murine ulcerative colitis. *J Biol Chem*. 2009; 284(17):11385-11395.
- [53] Gonzalez-Brito MR, Bixby JL. Protein tyrosine phosphatase receptor type o regulates development and function of the sensory nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 2009; 42(4):458-465.
- [54] Granot-Attas S, Elson A. Protein tyrosine phosphatases in osteoclast differentiation, adhesion, and bone resorption. *Eur J Cell Biol*. 2008; 87(8-9):479-490.
- [55] Granot-Attas S, Knobler H, Elson A. Protein tyrosine phosphatases in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2007; 17(1):49-71.
- [56] Gruenebach F, Weck MM, Reichert J, Brossart P. Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol*. 2002; 30:1309-1315.
- [57] Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. Er-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*. 2003; 425(6956):397-402.
- [58] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:621-667.
- [59] Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997; 90(9):3245-3287.

- [60] Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 1999;94(3):845-852.
- [61] Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:47-64.
- [62] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 myd88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002; 3(2):196-200.
- [63] Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood*. 2005;105:689-696.
- [64] Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2002; 168(9):4531-4537.
- [65] Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(7):521-531.
- [66] Jacob ST, Motiwala T. Epigenetic regulation of protein tyrosine phosphatases: potential molecular targets for cancer therapy. *Cancer Gene Ther*. 2005; 12(8):665-672.
- [67] Janke M, Witsch EJ, Mages HW, Hutloff A, and Kroczeck RA. Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*. 2006; 118(3):353-360.
- [68] Janning W, Knust E. *Genetik, Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008.
- [69] Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001; 31(11):3388-3393.
- [70] Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YL. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001; 194(6):863-869.
- [71] Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005; 6:1219-1227.
- [72] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 2001; 106:263-266.
- [73] Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 2001; 106(3):259-262.
-

- [74] Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 275-306.
- [75] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molekulare Zellbiologie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2001.
- [76] Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J Dermatol Sci.* 2007; 46:159-167.
- [77] Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, Piazza F, Yarilina A, Cortesini R, Mancini D, Suci-Foca N. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol.* 2003; 11:245-258.
- [78] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:991-1045.
- [79] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388(6640):394-397.
- [80] Miller RL, Meng TC, Tomai MA. The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News Perspect.* 2008; 21(2):69-87.
- [81] Motiwala T, Ghoshal K, Das A, Majumder S, Weichenhan D, Wu YZ, Holman K, James SJ, Jacob ST, Plass C. Suppression of the protein tyrosine phosphatase receptor type o gene (PTPRO) by methylation in hepatocellular carcinomas. *Oncogene.* 2003; 22(41):6319-6331.
- [82] Motiwala T, Kutay H, Ghoshal K, Bai S, Seimiya H, Tsuruo T, Suster S, Morrison C, Jacob ST. Protein tyrosine phosphatase receptor-type o (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(38):13844-13849.
- [83] Motiwala T, Majumder S, Ghoshal K, Kutay H, Datta J, Roy S, Lucas DM, Jacob ST. PTPRO inactivates the oncogenic fusion protein BCR/ABL and suppresses transformation of K562 cells. *J Biol Chem.* 2009; 284(1):455-464.
- [84] Motiwala T, Majumder S, Kutay H, Smith DS, Neuberg DS, Lucas DM, Byrd JC, Grever M, Jacob ST. Methylation and silencing of protein tyrosine phosphatase receptor type o in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(11):3174-3181.
- [85] Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.
- [86] Neel BG. Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9(3):405-420.
- [87] Okahira S, Nishikawa F, Nishikawa S, Akazawa T, Seya T, Matsumoto M. Interferon-beta induction through Toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol.* 2005; 24(10):614-623.
-

- [88] O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*. 2004; 104(8):2235-2246.
- [89] Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother*. 2008; 31(9):793-805.
- [90] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*. 2004; 16(1):23-26.
- [91] Pixley FJ, Lee PS, Dominguez MG, Einstein DB, Stanley ER. A heteromorphous protein-tyrosine phosphatase, PTP phi, is regulated by CSF-1 in macrophages. *J Biol Chem*. 1995; 270(45):27339-27347.
- [92] Pyke C, Kristensen P, Ostergaard PB, Oturai PS, Rømer J. Proteoglycan expression in the normal rat kidney. *Nephron*. 1997; 77(4):461-470.
- [93] Ramaswamy B, Majumder S, Roy S, Ghoshal K, Kutay H, Datta J, Younes M, Shapiro CL, Motiwala T, Jacob ST. Estrogen-mediated suppression of the gene encoding protein tyrosine phosphatase PTPRO in human breast cancer: mechanism and role in tamoxifen sensitivity. *Mol Endocrinol*. 2009; 23(2):176-187.
- [94] Rolf K. *Molekulare Genetik*, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001.
- [95] Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, Flemming A, Schamel WW, Zürn C, Reth M. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a SYK/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell*. 2002; 10(5):1057-1069.
- [96] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994; 179:1109-1118.
- [97] Scheduling S, Kratz-Albers K, Meister B, Brugger W, Kanz L. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells for clinical use. *Semin Hematol*. 1998; 35:232-240.
- [98] Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, and Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998; 393(6684):480-483.
- [99] Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*. 1999; 274(45):31868-31874.
- [100] Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2003; 15:138-147.
- [101] Seimiya H, Sawabe T, Inazawa J, Tsuruo T. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel gene for protein tyrosine phosphatase
-

(PTP-U2) induced by various differentiation-inducing agents. *Oncogene*. 1995; 10(9):1731-1738.

[102] Seimiya H, Sawabe T, Toho M, Tsuruo T. Phorbol ester-resistant monoblastoid leukemia cells with a functional mitogen-activated protein kinase cascade but without responsive protein tyrosine phosphatases. *Oncogene*. 1995; 11(10):2047-2054.

[103] Seimiya H, Tsuruo T. Differential expression of protein tyrosine phosphatase genes during phorbol ester-induced differentiation of human leukemia U937 cells. *Cell Growth Differ*. 1993; 4(12):1033-1039.

[104] Seimiya H, Tsuruo T. Functional involvement of PTP-U2L in apoptosis subsequent to terminal differentiation of monoblastoid leukemia cells. *J Biol Chem*. 1998; 273(33):21187-21193.

[105] Seya T, Funami K, Taniguchi M, Matsumoto M. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J Endotoxin Res*. 2005; 11(6):369-374.

[106] Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(2):116-126.

[107] Sheng MH, Amoui M, Stiffel V, Srivastava AP, Wergedal JE, Lau KH. Targeted transgenic expression of an osteoclastic transmembrane protein-tyrosine phosphatase in cells of osteoclastic lineage increases bone resorption and bone loss in male young adult mice. *J Biol Chem*. 2009; 284(17):11531-11545.

[108] Shortman K, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol*. 2001; 2(11):988-989.

[109] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(3):151-161.

[110] Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999; 284(5421):1835-1837.

[111] Süss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996; 183(4):1789-1796.

[112] Steinbrink K, Jonuleit H, Mueller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*. 1999; 93:1634-1642.

[113] Steinbrink K, Wolfi M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997; 159:4772-4780.

[114] Steinmann RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:685-711.

- [115] Stepanek L, Stoker AW, Stoeckli E, Bixby JL. Receptor tyrosine phosphatases guide vertebrate motor axons during development. *J Neurosci*. 2005; 25(15):3813-3823.
- [116] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004; 16(1):3-9.
- [117] Takeda K, Kaisho T, Shizuo Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:335-376.
- [118] Taniguchi Y, London R, Schinkmann K, Jiang S, Avraham H. The receptor protein tyrosine phosphatase, PTP-RO, is upregulated during megakaryocyte differentiation and is associated with the c-Kit receptor. *Blood*. 1999; 94(2):539-549.
- [119] Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2002; 195(1):99-111.
- [120] Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J Biol Chem*. 1994; 269(31):19953-19962.
- [121] Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998; 188(2):287-296.
- [122] Tian J, Wang HP, Mao YY, Jin J, Chen JH. Reduced glomerular epithelial protein 1 expression and podocyte injury in immunoglobulin A nephropathy. *J Int Med Res*. 2007; 35(3):338-345.
- [123] Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:975-1028.
- [124] Turner M, Gulbranson-Judge A, Quinn ME, Walters AE, MacLennan IC, and Tybulewicz VL. Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J Exp Med*. 1997; 186(12):2013-2021.
- [125] Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today*. 2000; 21(3):148-154.
- [126] Wassink L, Vieira PL, Smits HH, Kingsbury GA, Coyle AJ, Kapsenberg ML, Wierenga EA. ICOS expression by activated human T_H cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both T_H1 and T_H2 cells. *J Immunol*. 2004; 173(3):1779-1786.
- [127] Weissman D, Li Y, Orenstein JM, Fauci AS. Both a precursor and a mature population of dendritic cells can bind HIV. However, only the mature popu-
-

lation that expresses CD80 can pass infection to unstimulated CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995; 155(8):4111-4117.

[128] Wiggins RC, Wiggins JE, Goyal M, Wharram BL, Thomas PE. Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13. *Genomics.* 1995; 27(1):174-181.

[129] www.abcam.com

[130] www.ncbi.nlm.nih.gov

[131] Xu X, Hong Y, Kong C, Xu L, Tan J, Liang Q, Huang B, Lu J. Protein tyrosine phosphatase receptor-type o (PTPRO) is co-regulated by E2F1 and miR-17-92. *FEBS Lett.* 2008; 582(19):2850-2856.

Danksagung

Danken möchte ich...

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

... Herrn PD Dr. rer. nat. Grünebach für das Beantworten unserer vielen Fragen, die Hilfe bei der Planung der Versuche und die ausgezeichnete Unterstützung bei allen organisatorischen und wissenschaftlichen Problemen.

... meinem Mitdoktoranden Mark Schwarzbich für die gute Zusammenarbeit, fürs Aushelfen und die Gesellschaft während langer Laborstunden.

... Susanne Schmidt, dass sie sich so viel Zeit für meine Fragen und zum Korrekturlesen genommen hat. Das war überhaupt nicht selbstverständlich und deshalb vielen, vielen Dank!

... Anita Bringmann fürs Korrekturlesen, ihr Know-how, das Erklären der Versuche und die Geduld bei sehr vielen Fragen.

... Stefanie Held, Karin von Schwarzenberg und Katharina Brauer, dass sie in ihrem engen Labor immer noch Platz für mich hatten und mich beim Blot-Waschen unterhalten haben. Danke für Eure Hilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

... Sylvia, Solveig und Regina für die kompetente Unterstützung bei den Versuchen, für ihr offenes Ohr und die netten Gespräche in den Pausen.

... meinem Mann Alec dafür, dass er mich nicht nur bei dieser Arbeit unterstützt hat, mir Kraft gibt und meine Erfolge mit mir feiert. Danke für Deine Liebe, Deine Ausdauer bei allen projects und dass Du immer zu mir hältst.

... meinen Eltern, Geli und Ute, Omas, Opas, Tanten (Danke an Christine für die Hilfe!), Onkeln, Cousinen, Cousin, also meiner ganzen Familie, ihr wisst, welchen Anteil ihr an meinem erfolgreichen Studium und dem Weg dorthin hattet.

... Natalie, Marika, Rebecca, Isabel, Andra und Susi für ihre tolle Freundschaft während dem Studium. Ohne Euch wäre einiges in den sechs Jahren viel schwerer gewesen und hätte lang nicht so viel Spaß gemacht. Danke, dass jede auf ihre Art für mich da war.

... Tanya, Maryna und Gena für alle ihre Unterstützung.

... Theresa für das Korrigieren der Rechtschreibfehler und dass sie mir schon so lange eine gute Freundin ist.

... allen, die mir während dem Studium oder auf dem Weg dorthin irgendwie geholfen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Samal, geb. Böttle
Geburtsdatum: 09.06.1984
Geburtsort: Ludwigsburg

Schulbildung

1990 - 1994 Grundschohle Hoheneck
1994 - 2003 Mörike-Gymnasium Ludwigsburg
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

2003 - 2009 Eberhard Karls Universität Tübingen
Studium der Humanmedizin
2005 Erste Ärztliche Prüfung
12.11.2009 Zweite Ärztliche Prüfung, Note: 1,5
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung:
2,0
2009 Approbation als Ärztin

Famulaturen

03/2006 Neurologie,
Krankenhaus Bogenhausen München
09/2006 Hämatologie/Onkologie,
Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
08/2007 Allgemeinmedizin,
Praxis Tübingen
07/2008 Neonatologie,
Universitätsklinik Tübingen

Praktisches Jahr

08/2008 - 12/2008

Allgemeinchirurgie und Neurochirurgie, Universitätsklinik Tübingen

12/2008 - 04/2009

Hämatologie/Onkologie und Notaufnahme,

Universitätsklinik Tübingen

04/2009 - 07/2009

Neonatologie,

Universitätsklinik Tübingen

Promotion

2009

Annahme als Doktorandin bei Prof. Dr. Peter Brossart, Arbeitsgruppe experimentelle Immuntherapie, Medizinische Universitätsklinik II, Tübingen

Nebentätigkeiten

02/2007 - 02/2008

Wissenschaftliche Hilfskraft zur Dokumentation klinischer Studien in der GCP-Studienzentrale der Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Hämatologie/Onkologie