

**Effekt der Glycosylierung
von CD16 (Fc γ RIII) auf das
IgG-Bindungsverhalten**

von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Bettina Drescher
geboren am 12. Mai 1970
in Rheine/Westfalen

2001

Referent: Prof. Dr. R.E. Schmidt

Koreferent: Prof. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 13. Juli 2001

Zusammenfassung

Fc-Rezeptoren sind in der Lage, an den Fc-Teil von Immunglobulinen zu binden. Durch diese Bindung wird eine Zelltyp-spezifische Reaktion der Rezeptor-tragenden Zelle ausgelöst und eine Verbindung zwischen der humoralen und zellulären Immunantwort vermittelt. Der Fc γ RIII ist ein niedrig-affiner Rezeptor für IgG, der beim Menschen in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert wird: Der transmembrane Fc γ RIIIA bildet mit Homo- oder Heterodimeren der γ -Kette des Fc ϵ RI und der ζ -Kette des TCR einen multimeren Komplex, durch den die Signalkaskade weitergeleitet wird. Dieser Rezeptor wird auf Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Der Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Fc γ RIIIB ist auf neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Ein Polymorphismus des Fc γ RIIIB-Gens führt zu einem kodominanten biallelen NA-System (*neutrophil antigen*) des Rezeptors mit den beiden Allelen NA1 und NA2, die sich durch den Austausch weniger Aminosäuren unterscheiden. Das Allel NA1 des Fc γ RIIIB besitzt vier potentielle Asparagin-Glycosylierungsstellen, je zwei in der Membran-distalen Domäne I (N39 und N75) und in der Membran-proximalen Domäne II (N163 und N170). Die Glycosylierung an diesen Stellen zeigt eine starke Variabilität zwischen den einzelnen Molekülen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Glycosylierung des Fc γ RIII auf die IgG-Bindung an den Rezeptor untersucht. Dazu wurden die vier N-Glycosylierungsstellen des NA1-Allels zu Glutamin mutiert und die jeweiligen cDNAs in humane Nierenfibroblasten transfiziert. In einem Epitop-Mapping mit 10 verschiedenen Antikörpern konnten schwerwiegende Veränderungen in der Molekülstruktur der Rezeptoren ausgeschlossen werden. Die IgG-Bindungsstudien zeigten eine erhöhte Bindung der Mutante mit fehlender Glycosylierungsstelle N163. Diese N-Glycosylierungsstelle befindet sich innerhalb der Bindungsregion für IgG. Die Steigerung der gebundenen IgG-Menge bei Ausfall dieser Glycosylierungsstelle spricht für eine Inhibition der IgG-Bindung durch den Aufbau eines Zuckerbaumes am Asparagin 163. Durch den Einsatz der deglycosylierenden Substanz Tunicamycin konnte bei den anderen transfizierten Zellen die IgG-Bindung auf das Niveau der N163-Mutante erhöht werden.

Der Glycosylierungsgrad in vivo zeigt starke Variabilität. Deshalb wurde vermutet, daß sich im Verlauf entzündlicher Erkrankungen die Glycosylierung in N163 verändert und die Immunreaktion auf zirkulierte Immunkomplexe beeinflusst wird. Auf den Granulozyten von Patienten mit kryoglobulinämischer Vaskulitis konnte eine reduzierte IgG-Bindung an die Patientenzellen festgestellt werden. Weitere Untersuchungen zeigten eine Reduktion der Affinität von NK-Zellen gegenüber IgG durch die Gabe von Corticosteroiden.

Zusammenfassung

Der Glycosylierungsgrad des FcγRIII an der Aminosäure Asparagin 163 ist variabel und beeinflusst die Affinität des Rezeptors. Die Glycosylierung von Rezeptoren ist somit nicht nur von struktureller sondern auch von funktioneller Bedeutung als Regulationsmechanismus der Bindungsaffinität.

FcγRIII; N-Glycosylierung; IgG-Bindung

Summary

Fc receptors are capable of binding to the Fc part of immunoglobulins. Ligation of the receptor induces a cell type specific reaction and mediates the link between the humoral and antibody triggered cellular immune response. Fc γ RIII (CD16) is a low affinity receptor for IgG. There are two different receptor isoforms: The transmembraneous form Fc γ RIIIA is expressed on macrophages, monocytes, T cells and NK cells. It is associated with homo- or heterodimers of the γ -chain of Fc ϵ RI and the ζ -chain of the T cell receptor. The isoform Fc γ RIIIB is glycosylphosphatidylinositol-linked and is expressed on neutrophil granulocytes. A polymorphism of this gene causes a codominant biallelic NA-system (neutrophilic antigen) two alleles differing in few amino acids. The Fc γ RIIIB allele NA1 has four asparagine-linked glycosylation sites: two in the membrane-distal domain I (N39 and N75) and two in the membrane-proximal domain II (N163 and N170). Glycosylation of these four sites is highly variable.

Here the influence of glycosylation of Fc γ RIII on binding of IgG to the receptor is studied. We mutated the four glycosylation sites of the NA1 allele of CD16B to glutamine and transfected human kidney fibroblasts with mutated cDNAs. An epitope mapping with 10 different monoclonal antibodies excluded major structural alterations of the mutated receptors. Binding of human IgG was found to be increased to the receptor after mutating the glycosylation site N163. This asparagine-linked glycosylation site is located in the putative binding region of IgG. We suggest that the glycosylation at asparagine 163 inhibits binding of IgG to the receptor. Using the deglycosylating agent tunicamycin it is possible to enhance binding of IgG to the other receptors to the degree of N163Q.

The degree of glycosylation of Fc γ RIII in vivo is highly variable. We anticipated that the glycosylation changes during inflammatory diseases and the immune reaction on circulating immune complexes is altered.

As expected, experiments with granulocytes of patients with cryoglobulinemia confirmed a reduced binding of IgG to these cells in comparison to those of healthy controls. In addition the incubation of NK cells with corticosteroids resulted in a decreased binding of IgG to the cells.

Therefore, the level of glycosylation of CD16 at the site asparagine 163 is extremely variable and influences the affinity of the receptor to its ligand. Glycosylation of receptors plays a structural and a functional role in the regulation of receptor affinity.

Fc γ RIII; N-glycosylation; IgG binding

1.	Einleitung	
1.1	Fc-Rezeptoren	1
1.2	Struktur der humanen Fcγ-Rezeptoren	1
1.2.1	Fc γ RI (CD64)	2
1.2.2	Fc γ RII (CD32)	3
1.2.3	Fc γ RIII (CD16)	4
1.2.4	Lösliche Fc γ -Rezeptoren	4
1.3	Signaltransduktion und Funktion der Fcγ-Rezeptoren	5
1.4	Bindung von IgG durch Fcγ-Rezeptoren	6
1.5	Glycoproteine	7
1.6	N-Glycosylierung des FcγRIII	8
1.7	Zielsetzungen	10
2.	Material und Methoden	
2.1	Allgemeine Materialien	11
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	12
2.3	Bakterienstämme	12
2.4	Säugerzellen	12
2.5	Vektoren	13
2.6	Antikörper	13
2.7	Oligonukleotide	14
2.8	DNA-Analysen	15
2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA in analytischem Maßstab (Miniprep)	15
2.8.1.1	Prinzip	15
2.8.1.2	Material	15
2.8.1.3	Durchführung	15
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab (Maxiprep)	16
2.8.2.1	Prinzip	16
2.8.2.2	Material	16
2.8.2.3	Durchführung	16
2.8.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	17
2.8.3.1	Prinzip	17
2.8.3.2	Material	17
2.8.3.3	Durchführung	17

2.8.4	DNA-Gelelektrophorese	18
2.8.4.1	Prinzip	18
2.8.4.2	Material	18
2.8.4.3	Durchführung	18
2.8.5	PCR-DNA und Agarosegel-Banden-Aufreinigung	18
2.8.5.1	Prinzip	18
2.8.5.2	Material	19
2.8.5.3	Durchführung	19
2.8.6	Enzymatische DNA-Modifikation	19
2.8.6.1	Prinzip	19
2.8.6.2	Material	19
2.8.6.3	Durchführung	20
2.8.7	Präparation und Transformation kompetenter Bakterien	20
2.8.7.1	Prinzip	20
2.8.7.2	Material	20
2.8.7.3	Durchführung	20
2.8.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.8.8.1	Prinzip	21
2.8.8.2	Material	21
2.8.8.3	Durchführung	21
2.8.9	Verknüpfungsreaktion	22
2.8.9.1	Prinzip	22
2.8.9.2	Material	22
2.8.9.3	Durchführung	22
2.9	Zellkultur-Methoden	23
2.9.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	23
2.9.1.1	Prinzip	23
2.9.1.2	Material	23
2.9.1.3	Durchführung	23
2.9.2	Kultur von NK-Zellen	24
2.9.2.1	Prinzip	24
2.9.2.2	Material	24
2.9.2.3	Durchführung	24
2.9.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	25
2.9.3.1	Prinzip	25
2.9.3.2	Material	25
2.9.3.3	Durchführung	25

Inhaltsverzeichnis

2.9.4	Ermittlung der Zellzahl	26
2.9.4.1	Prinzip	26
2.9.4.2	Material	26
2.9.4.3	Durchführung	26
2.9.5	FACS-Analyse	26
2.9.5.1	Prinzip	26
2.9.5.2	Material	27
2.9.5.3	Durchführung	27
2.9.6	Stabile Transfektion	27
2.9.6.1	Prinzip	27
2.9.6.2	Material	28
2.9.6.3	Durchführung	28
2.9.7	IgG-Bindungsassay	29
2.9.7.1	Prinzip	29
2.9.7.2	Material	29
2.9.7.3	Durchführung	29
2.9.8	Tunicamycin-Assay	30
2.9.8.1	Prinzip	30
2.9.8.2	Material	30
2.9.8.3	Durchführung	30
2.9.9	Dexamethason-Assay	31
2.9.9.1	Prinzip	31
2.9.9.2	Material	31
2.9.9.3	Durchführung	31
2.9.10	Zytotoxizitäts-Assay	32
2.9.10.1	Prinzip	32
2.9.10.2	Material	32
2.9.10.3	Durchführung	33

3. Ergebnisse

3.1	Herstellung der CD16-Konstrukte	34
3.1.1	PCR-Mutagenese	34
3.1.2	Klonierung der mutierten DNAs an die GPI-Verankerungssequenz	36
3.2	Transfektion	37
3.3	Epitope-mapping	38
3.4	Kontrolle der FcγR-Expression auf transfizierten Zellen	41
3.5	Bindung von humanem monomerem IgG	42

3.6	Einfluß der Deglycosylierung der Fcγ-Rezeptoren auf transfizierten Zellen	44
3.7	Einfluß der Deglycosylierung auf NK-Zellen	47
3.8	IgG-Bindung an Granulozyten von Patienten mit kryoglobulinämischer Vaskulitis	49
3.9	IgG-Bindung an NK-Zellen eines Sarkoidose-Patienten	50
3.10	Einfluß von Dexamethason auf NK-Zellen	53
4.	Diskussion	
4.1	Charakterisierung verschiedener CD16-transfizierter Zellen	56
4.2	Einfluß von Tunicamycin und Dexamethason auf die Bindung von IgG an NK-Zellen	58
4.3	Physiologische Bedeutung der Glycosylierung des FcγRIII	60
5.	Abkürzungsverzeichnis	62
6.	Literatur	64
7.	Danksagung	75
8.	Lebenslauf	76

1 Einleitung

1.1 Fc-Rezeptoren

Die Fc-Rezeptoren stellen eine heterogene Gruppe von Proteinen dar, die von allen Zellen des Immunsystems in unterschiedlichen Mengen und Zusammensetzungen exprimiert werden. Sie sind in der Lage, die Fc-Region von Immunglobulinen zu binden und sind deshalb ein wesentliches Bindeglied zwischen dem humoralen und zellulären Immunsystem. Fc-Rezeptoren wurden für alle Klassen von Immunglobulinen beschrieben. Sie werden je nach dem Isotyp des zu bindenden Immunglobulins mit griechischen Buchstaben bezeichnet und durch ihre Spezifität in verschiedene Klassen eingeteilt: Fc μ R für IgM, Fc γ R für IgG, Fc ϵ R für IgE, Fc α R für IgA und Fc δ R für IgD.

Zu den Funktionen der Fc-Rezeptoren gehören die Aktivierung verschiedener Effektorzellen des Immunsystems, die Vermittlung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), die Induktion der Phagozytose von pathogenen Keimen und zirkulierenden Immunkomplexen (Ravetch and Kinet, 1991; van de Winkel and Anderson, 1991; Hulett and Hogarth, 1994). Für einige Mitglieder der Fc-Rezeptoren ist die Induktion der Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Histamin, H₂O₂) und von Zytokinen bekannt.

1.2 Struktur der humanen Fc γ -Rezeptoren

Die verschiedenen Mitglieder der Gruppe der Fc-Rezeptoren besitzen eine sehr heterogene Struktur und ein differentielles Expressionsmuster auf den Zellen des hämatopoetischen Systems. Durch diese Unterschiede lassen sich die vielfältigen Funktionen der Rezeptoren erklären. Da IgG das häufigste Immunglobulin im humanen System darstellt, kommt den Fc-Rezeptoren für IgG, den sogenannten Fc γ -Rezeptoren, eine tragende Rolle in der Immunabwehr zu.

Die Struktur der extrazellulären Bereiche der Fc γ -Rezeptoren wird durch zwei bzw. drei Immunglobulin-ähnliche Domänen bestimmt. Charakteristisch sind zwei konservierte Cysteinreste innerhalb jeder Domäne, die intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden und auf diese Weise zur Stabilität der Domänenstruktur beitragen. Die extrazellulären Bereiche der Fc γ -Rezeptoren weisen im Gegensatz zu den zytoplasmatischen Anteilen eine hohe Homologie untereinander auf (>50%).

Durch Bindung von Immunkomplexen an die membrangebundenen Rezeptoren werden in den Zellen die verschiedensten Reaktionen ausgelöst. Die Vermittlung dieser Funktionen erfolgt über die zytoplasmatischen Anteile der Fc-

Einleitung

Rezeptoren oder über deren assoziierte Proteine. Die einzelnen Formen der Fc γ R besitzen unterschiedliche intrazelluläre Anteile, aus denen die Isoform-spezifischen Aufgaben der Rezeptoren resultieren. Eine durchgehende Homologie innerhalb dieser Bereiche ist nicht erkennbar.

Die humanen Fc γ -Rezeptoren werden in drei Klassen eingeteilt, die aus mehreren Isoformen der einzelnen Rezeptoren bestehen.

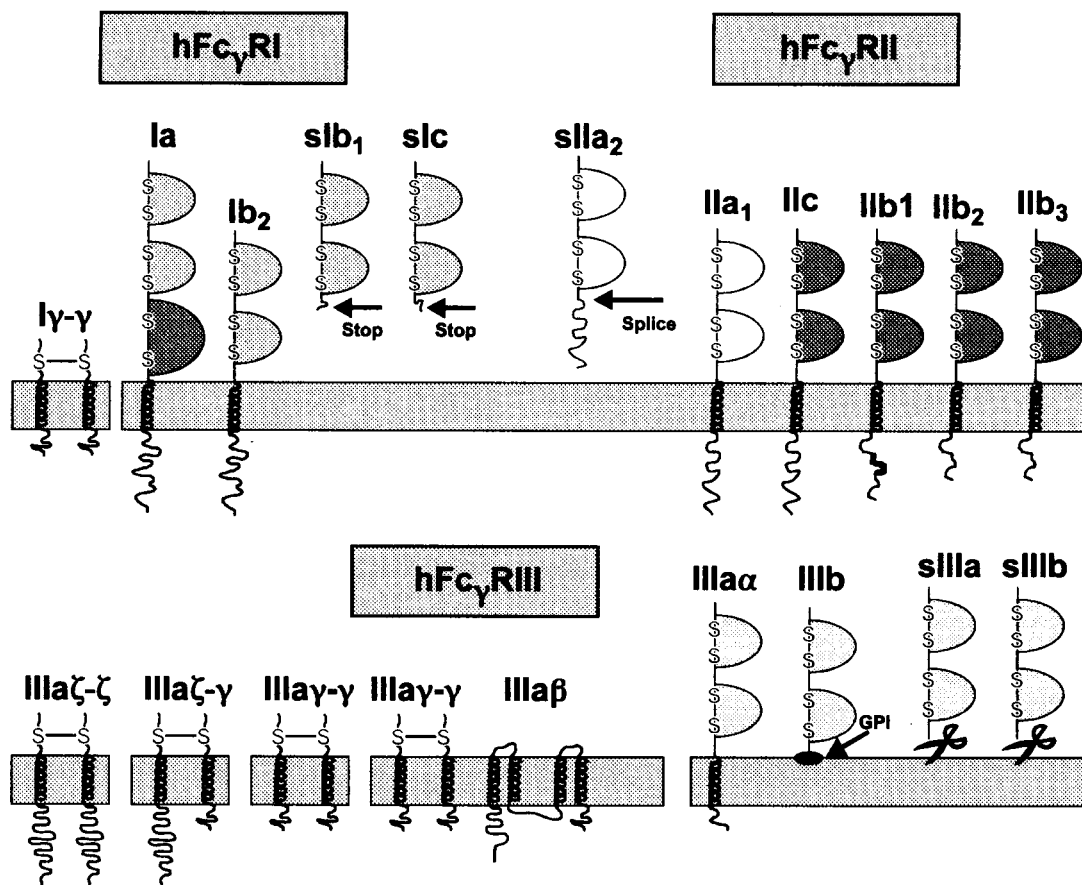


Abbildung 1: Die humanen Fc γ -Rezeptoren (nach van de Winkel & Capel, 1993)

1.2.1 Fc γ RI (CD64)

Der Fc γ RI besitzt als einziger der Fc γ R eine dritte extrazelluläre Domäne (Abb. 1), die für die höhere Affinität des Rezeptors gegenüber humanem IgG verantwortlich gemacht wird (van de Winkel and Capel, 1993). Die beiden distalen Domänen zeigen hohe Homologien zu den Rezeptoren der anderen Fc γ R-Klassen. Der Fc γ RI wird in Komplexen mit dem Homodimer der γ -Ketten des Fc ϵ RI konstitutiv auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert (Ernst *et*

al., 1993), während die Expression auf Neutrophilen und Eosinophilen durch IFN γ induzierbar ist. Es existieren drei homologe Gene für Fc γ RI (IA, IB und IC), wobei nur IA für ein intaktes transmembranes Protein mit einem zytoplasmatischen Anteil von 61 Aminosäuren codiert (Allen and Seed, 1989). Die beiden anderen Gene besitzen Terminations-Codons innerhalb der dritten extrazellulären Domäne und codieren für lösliche Formen des Rezeptors (Abb. 1; Ernst *et al.*, 1992). Durch alternatives Splicing des Fc γ RIB-Gens entsteht eine kürzere, transmembrane Form des Proteins, die keine dritte extrazelluläre Domäne besitzt.

1.2.2 Fc γ RII (CD32)

Der niedrigaffine Rezeptor Fc γ RII ist von den Fc-Rezeptoren am weitesten verbreitet. Er wird auf Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen, Eosinophilen, Thrombozyten, Langerhans-Zellen, B-Zellen, diversen Subtypen der T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert. Die sechs verschiedenen Transkripte des Fc γ RII werden von drei Genen codiert (IIA, IIB und IIC). Die Proteine enthalten je zwei homologe Ig-ähnliche extrazelluläre Domänen und eine Transmembranregion. Sie unterscheiden sich durch verschiedene zytoplasmatische Bereiche (44-76 Aminosäuren; Abb. 1; Hibbs *et al.*, 1988). Dies ermöglicht die Übertragung verschiedener Signale in die Zelle und die Vermittlung unterschiedlicher zellulärer Reaktionen. Die zwei Transkripte des Fc γ RIIA codieren für eine transmembrane Isoform (Fc γ RIIA1) und den löslichen Fc γ RIIA2 (Astier *et al.*, 1994). Die lösliche Form des Proteins entsteht durch ein Splicing der transmembranen Region. Durch den Austausch der Aminosäure an der Position 131 (Histidin bzw. Arginin) entstehen zwei allele Isoformen des Fc γ RIIA1 (Warmerdam *et al.*, 1991). Das Gen Fc γ RIIB codiert drei Transkripte mit unterschiedlich langen zytoplasmatischen Anteilen (Splicing-Variante) oder verkürztem Signalpeptid (Brooks *et al.*, 1989). Für das Gen Fc γ RIIC ist nur ein einziges Transkript bekannt. Diese Variante ist wahrscheinlich durch ein Crossingover-Ereignis entstanden, da sie in verschiedenen Bereichen starke Homologien zu den Genen IIA bzw. IIB aufweist (Warmerdam *et al.*, 1992). Der cytoplasmatische Bereich des Fc γ RIIA enthält ein ITAM (*immuno receptor tyrosine-based activation motif*), das strukturelle Ähnlichkeit mit der FcR γ -Kette besitzt und für die Auslösung von Ca²⁺-Flux und Phagozytose verantwortlich ist. In vivo Experimente mit Fc γ RII-defizienten Mäusen weisen auf die Funktion des Fc γ RIIB als genereller negativer Regulator hin, da diese Mäuse eine allgemein erhöhte Antwort auf Antigenstimulation zeigen (Takai *et al.*, 1996).

1.2.3 Fc γ RIII (CD16)

Der Rezeptor Fc γ RIII weist ebenfalls zwei Ig-ähnliche, extrazelluläre Domänen auf. Es handelt sich um ein heterogenes, stark glycosyliertes Protein (Lanier *et al.*, 1989), das im humanen System durch zwei verschiedene Gene vertreten ist: Fc γ RIIIA codiert für einen transmembranen Rezeptor, der auf Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird (Abb. 1; Peltz *et al.*, 1989; Ravetch & Perussia, 1989). Hierbei ist die Coexpression assoziierter Ketten essentiell (Lanier *et al.*, 1989). Es wurden Assoziationen mit Homo- und Heterodimeren der γ -Kette des Fc ϵ RI und der ζ -Kette des TCR beobachtet (Abb. 1; Letourneur *et al.*, 1991). Diese Dimere treten über die Transmembranregion mit dem Fc-Rezeptor in Wechselwirkung und sind entscheidend an der Signaltransduktion beteiligt (Park *et al.*, 1993). Durch den Austausch der Aminosäure 49 der membrandistalen Domäne des Fc γ RIIIA (Leucin, Histidin oder Arginin) entstehen triallele Isoformen des Rezeptors (de Haas *et al.*, 1995). Der Fc γ RIIIB wird nur auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. Bei dieser Isoform entsteht ein neues Stopcodon durch einen Nucleotidaustausch in der Sequenz der Transmembranregion. Das resultierende verkürzte Protein wird durch posttranslationale Modifikation über einen Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker auf der Zelloberfläche fixiert (Lanier *et al.*, 1989; Ravetch & Perussia, 1989). Ein Polymorphismus des Fc γ RIIIB-Gens führt zu einem kodominanten biallelen NA-System (*neutrophil antigen*) des Rezeptors (Huizinga *et al.*, 1990). Die beiden Allele NA1 und NA2 unterscheiden sich durch den Austausch weniger Aminosäuren, der unter anderem zu zwei zusätzlichen Glycosylierungsstellen im NA2-Allel führt. Die beiden NA-Allele können mit einigen CD16-spezifischen monoklonalen Antikörpern unterschieden werden: CLB-Gran 11 erkennt den NA1-, GRM1 den NA2-Allotyp. Zur Expression des Fc γ RIIIB sind keine assoziierten Ketten erforderlich.

1.2.4 Lösliche Fc γ -Rezeptoren (sFc γ R)

Es existieren verschiedene Formen der Fc γ -Rezeptoren, denen die Verankerung in der Membran fehlt. Sie besitzen keine Transmembranregion bzw. GPI-Verankerung, sind aber dennoch in der Lage, IgG zu binden, und werden definitionsgemäß als lösliche Fc γ -Rezeptoren bezeichnet (sFc γ R; De Haas *et al.*, 1994). Es existieren verschiedene Mechanismen, die zur Entstehung löslicher Rezeptoren führen: Die Proteolyse der membranständigen Rezeptoren durch Proteinasen (Shedding; Bazil & Strominger, 1994; Galon *et al.*, 1998), eigenständige Gene mit zusätzlichen Stopcodons und die Entfernung der Transmembranregion durch alternatives Splicing (Rappaport *et al.*, 1993). Eine physiologische Rolle der

löslichen Rezeptoren entsteht durch Bindung von humanem IgG ohne Auslösen einer intrazellulären Reaktion. Ein Beispiel ist die Unterdrückung der Arthus Reaktion in Mäusen durch Komplexierung der Antikörper mit löslichem Fc γ RII (Ierino *et al.*, 1993).

1.3 Signaltransduktion und Funktion der Fc γ -Rezeptoren

Durch Bindung von Immunkomplexen an die Membran-gebundenen Fc-Rezeptoren werden in der Zelle die verschiedensten Effektorfunktionen ausgelöst: Phagozytose, ADCC, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Regulation der B-Zell-Aktivität. Sie sind essentiell für die Clearance von pathogenen Keimen und Immunkomplexen (Hulett & Hogarth, 1994). Diese Funktionen werden über die zytoplasmatischen Anteile der Fc-Rezeptoren bzw. ihrer assoziierten Proteine vermittelt. Zwei Hauptsequenzmotive sind für die Weiterleitung des Signals von den Rezeptoren in die Zelle verantwortlich: Der intrazelluläre Anteil der γ -Kette des Fc ϵ RI, die mit dem Fc γ RI und RIII assoziiert ist, enthält ein ITAM (*immuno receptor tyrosine-based activation motif*), welches ebenfalls in verschiedenen Ketten des B-Zell- und T-Zell-Rezeptors vorkommt (Cambier, 1995; Thomas, 1995). Ein ähnliches ITAM ist in dem Fc γ RIIA-Rezeptor vorhanden. Für die verschiedenen Isoformen des Fc γ RIIB konnte eine inhibitorische Funktion gezeigt werden, die durch ein ITIM (*immuno receptor tyrosine-based inhibitory motif*) vermittelt wird (van den Herik-Oudijk *et al.*, 1994). In beiden Motiven existieren charakteristische Tyrosin-haltige Aminosäuresequenzen, deren Phosphorylierung die Signalkaskade in der Zelle initiiert.

Fc γ -Rezeptoren sind an mehreren pathologischen Reaktionen des Immunsystems beteiligt. So führt die IgG-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion (Typ II) durch die Interaktion der Antikörper gegen zelluläre Antigene mit Fc-Rezeptoren und/oder Komplement zur Lyse von Thrombozyten bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP; Witte *et al.*, 1993) oder zur Erythrozytolyse bei der autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA; Snyder *et al.*, 1995). Die Bedeutung der Fc γ R bei diesen Erkrankungen konnte in Experimenten mit Fc γ R-defizienten Mäusen gezeigt werden, in denen weder ITP noch AIHA induzierbar sind (Clynes & Ravetch, 1995; Takai *et al.*, 1994). Zur Therapie der ITP können hohe Dosen humaner Immunglobuline verwendet werden, um die Fc γ -Rezeptoren zu blockieren (Schmidt *et al.*, 1981).

Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (SLE, Sjögren-Syndrom, rheumatoide Arthritis und Vaskulitiden) wird ein Anstieg der IgG-Immunkomplexkonzentration beobachtet. Diese Komplexe lösen durch die Aktivierung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen eine Reaktion des

Typs III (nach Gell und Coombs) aus, für die der Fc γ RIII essentiell ist. Das experimentelle Modell für diesen Typ der Hypersensibilität, die Arthus-Reaktion, ist bei Mäusen, die keinen Fc γ RIII exprimieren, nicht auslösbar (Sylvestre & Ravetch, 1994; Sylvestre & Ravetch, 1996; Hazenbos *et al.*, 1996). Als Modell für die humane Lupus-Nephritis dient die NZB/NZW-Maus (*New Zealand Black/New Zealand White*), bei der Veränderungen in drei Gen-Loci zur Manifestation einer autoimmunen Glomerulonephritis führen. Wird in diesen Tieren die γ -Kette der Fc-Rezeptoren ausgeschaltet, kommt es zu einem späteren Auftreten der Krankheit mit abgeschwächten Symptomen und verminderter Mortalität (Clynes *et al.*, 1998).

1.4 Bindung von IgG durch Fc γ -Rezeptoren

Die Mitglieder der Gruppe der Fc γ -Rezeptoren sind in der Lage, an die Fc-Region von Immunglobulinen der Klasse G zu binden. Diese Klasse der Immunglobuline ist durch vier verschiedene Isotypen vertreten: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, die jeweils aus zwei schweren und zwei leichten Proteinketten aufgebaut sind. Dabei wird die leichte Kette aus den Domänen VL und CL, die schwere Kette aus den Domänen VH, CH1, CH2 und CH3 gebildet (Silverton *et al.*, 1977). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Isotypen bestehen in den variablen Regionen der Ketten, während innerhalb der konstanten Bereiche hohe Sequenz-Homologien existieren. Im Vergleich der konstanten Domänen zeigt sich die höchste Diversität in der *Hinge*-Region, dem Übergang zwischen Fc- und Fab-Teil der Antikörper. Diese Region ermöglicht dem Molekül seine Flexibilität und vermittelt die Verbindung der schweren Ketten untereinander über mehrere Cystein-Reste (Dangl *et al.*, 1988; Brekke *et al.*, 1993). Durch Mutagenese-Studien konnte gezeigt werden, daß der untere Bereich dieser *Hinge*-Region bei der Bindung an die Fc γ -Rezeptoren eine wichtige Rolle spielt. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren dieses Bereiches konnte die Bindung an die verschiedenen Fc-Rezeptoren inhibiert werden (Duncan *et al.*, 1988; Jefferis *et al.*, 1990). Außerhalb der *Hinge*-Region sind einzelne Aminosäurereste der CH2- und CH3-Domänen an der Bindung zwischen Immunglobulin und FcR beteiligt (Chappel *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1994).

Der extrazelluläre Anteil der Fc γ -Rezeptoren setzt sich aus zwei (Fc γ RIB, II und III) oder drei (Fc γ RIA) Domänen zusammen. Diese Domänen bestehen aus jeweils sieben antiparallelen β -Faltblattstrukturen, die durch Schleifen (*loops*) miteinander verbunden sind (Unkeless *et al.*, 1988). Dabei ist die Membranproximale Domäne für die Bindung von IgG an den Rezeptor entscheidend (Ierino *et al.*, 1993a). Die Membran-distalen Domänen haben keine Bedeutung für die Ligandenbindung (Hibbs *et al.*, 1994). Mit Hilfe gezielter Mutationen konnte für den Fc γ RIII gezeigt werden, daß die Aminosäuren des FG-*Loops* (160-163; Glutamin-

Serin-Lysin-Asparagin) eine besonders große Rolle spielen (Tamm *et al.*, 1996). Auch einzelne Austausche der Aminosäuren Lysin¹⁶² oder Valin¹⁶⁴ resultierten in einer verminderten Ligandenbindung (Tamm *et al.*, 1996). Der Rezeptor mit der Mutation der Aminosäure Valin¹⁶⁴ war nicht mehr in der Lage, IgG zu binden. Zusätzlich zu den genannten Aminosäuren sind einzelne Aminosäuren anderer *Loops* an der IgG-Bindung beteiligt. Hierzu gehören Glutamin¹²⁶ (*CC'-Loop*) und Arginin¹⁵⁶ (F β -Strang). In der Kalottenpräsentation der extrazellulären Domänen des Fc γ RIII wird deutlich, daß sich die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste auf einer Oberfläche der zweiten Domäne befinden, die der ersten Domäne zugewandt ist. Hier bilden sie eine diskontinuierliche Bindungsstelle für IgG. In Cokristallisationsexperimenten des Fc γ RIII mit humanen IgG1-Fc-Fragmenten konnten die Bindungsregionen beider Reaktionspartner bestätigt werden: Bindung des IgG-Fragments über die CH2-Domänen und die Hinge-Region an die Membranproximale Domäne des Fc γ RIII (Sondermann *et al.*, 2000). Während der Komplexbildung konnte eine Vergrößerung des Winkels zwischen den beiden Domänen des Fc-Rezeptors und eine asymmetrische Öffnung der beiden Ketten des IgG-Fc-Fragments beobachtet werden (Sondermann *et al.*, 2000).

1.5 Glycoproteine

Bei der Gruppe der Glycoproteine handelt es sich um Makromoleküle, die aus Polypeptidkette und Oligosacchariden zusammengesetzt sind. Ihre Biosynthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum, die Anknüpfung der Kohlehydrat-Seitenketten findet in den Zisternen des Golgi-Apparates statt. Die Verknüpfungsart ist entweder O-glycosidisch mit der Hydroxygruppe eines Serin- oder Threonin-Restes oder N-glycosidisch am Amid-Stickstoff eines Asparagin-Restes.

Bei der Entstehung der O-Glycoside werden die einzelnen Zuckerreste durch Nucleotidphosphat-aktivierte Kohlenhydrate zur Verfügung gestellt. Die Anlagerung wird durch spezifische Transferasen katalysiert. Die Bildung der N-Glycoside am Asparagin erfolgt über Dolichol-Diphosphat als aktivierende Komponente. Dabei werden die Zucker-Komponenten (meist Mannose- und Glucose-Reste) zuerst am Dolichol-Diphosphat aufgebaut und anschließend auf die Amid-Gruppe des Asparagins übertragen. Die endgültigen Oligosaccharid-Seitenketten entstehen durch spezifische Transferasen erst nach der Anknüpfung an die Aminosäure. Charakteristisch für die an Asparagin gebundenen Oligosaccharidketten ist die Verzweigung des Zuckerbaumes, die sich im ganzen Verlauf der Seitenketten fortsetzt (Karlson *et al.* 1994).

Im humanen System existieren zwei Hauptgruppen der Glycoproteine: Lösliche Formen in Sekreten und Körperflüssigkeiten und Membran-gebundene Proteine. Bei letzteren durchzieht der Proteinanteil als integrales Protein die gesamte Zellmembran, die Kohlenhydrat-Seitenketten ragen in den Extrazellularraum. Wichtige Vertreter beider Gruppen sind Immunglobuline, Komponenten des Komplementsystems, Hormone und die Blutgruppen-Antigene.

1.6 N-Glycosylierung des Fc γ RIII

Bei beiden Isoformen des Fc γ -Rezeptors III handelt es sich um stark glycosyliert vorliegende Proteine. Die Rezeptorform Fc γ RIIIB wird auf neutrophilen Granulozyten exprimiert und ist über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden. Ein Polymorphismus des Fc γ RIIIB-Gens führt zu einem kodominanten biallelen NA-System (*neutrophil antigen*) des Rezeptors (Huizinga *et al.*, 1990) mit den Allelen NA1 und NA2. Diese beiden Allele unterscheiden sich durch wenige Aminosäureaustausche, die zu zwei zusätzlichen Asparagin-Glycosylierungsstellen in NA2 führen. Das Allel NA1 besitzt vier potentielle Asparagin-Glycosylierungsstellen (Hulett and Hogarth, 1994), je zwei in der Membran-distalen Domäne I (N39 und N75) und in der Membran-proximalen Domäne II (N163 und N170). Die Glycosylierung an diesen Stellen zeigt eine starke Variabilität zwischen den einzelnen Molekülen. Die Fc γ RIIIA-Rezeptoren von NK-Zellen und Monozyten/Makrophagen zeigen unterschiedliche Affinitäten zu IgG und zu dem blockierenden Antikörper 3G8, dessen Epitop innerhalb der Bindungsregion liegt. Dieser Effekt ist auf eine Zelltyp-spezifische Glycosylierung der Rezeptoren zurückzuführen: Die Glycosylierungen von NK-Zell-Fc γ RIIIA enthalten hohe Mannose-Anteile, die zu einem veränderten Aufbau der Zuckerbäume und zu einer erhöhten Affinität der Rezeptoren führt (Edberg & Kimberly, 1997). In BIAcore-Affinitäts-Analysen mit eukaryotischen (glycosylierten) und prokaryotischen (unglycosylierten) Fc γ -Rezeptoren konnte gezeigt werden, daß die Glycosylierung von Fc γ RIII die Affinität zu IgG3 vermindert (Galon *et al.*, 1997), während die Affinität zu dem besser bindenden IgG1 nahezu unbeeinflusst bleibt.

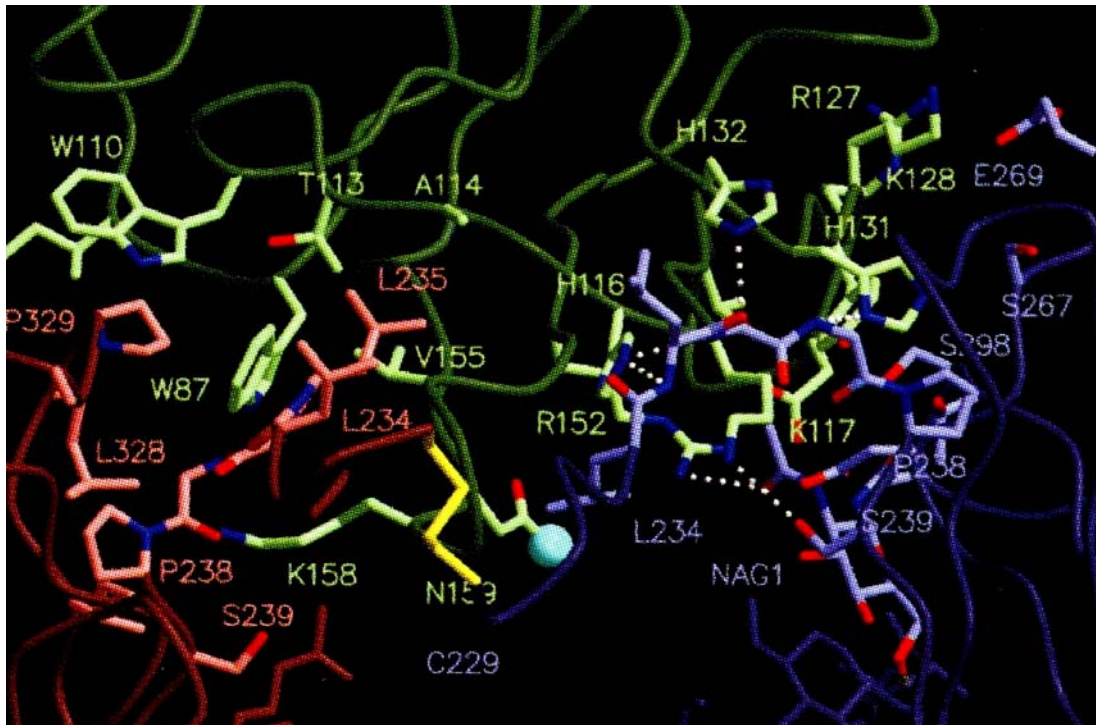


Abbildung 2: Kristallstruktur der Bindungsstelle von Fc γ RIII und IgG1 (Sondermann *et al.*, 2000)

Gezeigt ist eine Detailaufnahme der Bindungsstelle im Cokristall aus löslichem Fc γ RIII (grün) und dem IgG-Fc-Fragment (Teile der CH2-Domänen; rot und blau). Potentielle Wasserstoffbrücken zwischen den Molekülen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die blaue Kugel markiert die Aminosäure Asparagin¹⁶³ als N-Glycosylierungsstelle innerhalb der Bindungsregion.

In Kokristallisationsexperimenten des Fc γ RIII mit humanen IgG1-Fc-Fragmenten konnten die Bindungsregionen beider Reaktionspartner bestätigt werden: Bindung des IgG-Fragments über die CH2-Domänen und die Hinge-Region an die Membranproximale Domäne des Fc γ RIII. Der Kristall zeigt die Lage des Asparagin¹⁶³ als potentielle N-Glycosylierungsstelle in der Mitte der Bindungsregion (Abb. 2; Sondermann *et al.*, 2000).

1.7 Zielsetzungen

Die Gruppe der Fc-Rezeptoren ist an der Pathogenese verschiedener immunologischer Erkrankungen beteiligt. Dabei spielt die Bindung von Immunkomplexen an Fc γ RIII eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Neutrophilen, Makrophagen und NK-Zellen. Die Bindungsregionen der beiden Bindungspartner konnten durch gezielte Mutationen identifiziert und durch Kokristallisationsexperimente bestätigt werden. Es erfolgt die Bindung des IgG1 über die CH2-Domänen und die Hinge-Region an die Membran-proximale Domäne des Fc γ RIII. Innerhalb der Bindungsregion des Fc γ RIIIB befindet sich die N-Glycosylierungsstelle Asparagin¹⁶³, die in anderen Spezies konserviert ist. Da die Glycosylierung von CD16 stark variiert, ist eine sterische Behinderung der Bindung zwischen Fc-Rezeptor und IgG durch die Anlagerung eines Zuckerbaumes an diese Aminosäure denkbar.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Funktion der Glycosylierung von CD16 (Fc γ RIIIB) innerhalb der IgG-Bindungsstelle.

Das Projekt gliederte sich dabei in folgende Teile:

- 1.) Um den Einfluß der Glycosylierung auf die Bindung von IgG untersuchen zu können, sollten die vier Asparagin-Glycosylierungsstellen des Fc γ RIIIB NA1 gezielt zu Glutamin mutiert und damit ausgeschaltet werden.
- 2.) Eine Untersuchung der Mutationseffekte setzte eine definierte Expression der Fc-Rezeptoren voraus. Deshalb wurde die stabile Transfektion von humanen Nierenfibroblasten als Testsystem gewählt.
- 3.) Diese Transfektion ermöglichte die durchflußzytometrische Untersuchung der Bindung von IgG an die verschiedenen mutierten Rezeptoren im Vergleich zum unveränderten Wildtyp.
- 4.) Mit Hilfe der transfizierten Zellen und einer Fc-Rezeptor-exprimierenden NK-Zell-Linie sollte der Einfluß deglycosylierender Agentien (Tunicamycin, Dexamethason) auf die Bindung von IgG untersucht werden.
- 5.) Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der Glycosylierung als regulierender Mechanismus der IgG-Bindung sollten Granulozyten von Normal Spendern mit denen von Patienten mit kryoglobulinämischer Vaskulitis verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien

Agarplatten	LB-Medium 1,5%(w/v) Bacto-Agar (Difco) 100 µg Ampicillin/ml oder 50 µg Kanamycin/ml
LB-Medium	1%(w/v) Trypton (AppliChem) 0,5%(w/v) Hefe-Extrakt (AppliChem) 1%(w/v) NaCl pH 7,0
PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,45 mM KH ₂ PO ₄
SOC-Medium	2%(w/v) Trypton (AppliChem) 0,5%(w/v) Hefe-Extrakt (AppliChem) 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glucose pH 7,0
TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TBE	89 mM Tris-HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0
TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,4

Material und Methoden

6x Sample Buffer für DNA	6 ml 50xTAE
	44 ml Glycerin
	1 Spatelspitze Bromphenolblau

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Bulcher, AppliChem, Baker, Becton-Dickinson, Biomol, Boehringer Mannheim, BRL, Difco, Fluka, Genomed, Hartmann, ICN, Merck, New England Biolabs, Pierce, Qiagen, Riedel de Haen, Roth, Serva, Sigma und Stratagene verwendet. Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Beckmann, Costar, Eppendorf, Eurogentec, Falcon, Kodak, Gilson, Sarstedt, Schleicher+Schuell und Whatman. Lösungen für die Zellkultur wurden von Seromed/Biochrom bezogen.

2.3 Bakterienstämme

XL1-Blue	<i>F'::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lac</i>
INVαF'	<i>F' endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U16 λ⁻</i>
TOP10F'	<i>F' {lacI^q Tn10 (Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 DlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>

2.4 Säugerzellen

HEK293	humane Nierenzell-Linie (epithelial), adhärent
--------	--

2.5 Vektoren

pCR2.1	Invitrogen Der Vektor pCR2.1 wird in linearisierter Form geliefert. Er enthält eine TA-Klonierungsstelle, die zum Inserieren von PCR-Produkten mit A-Überhängen genutzt wird. Ein vorgeschalteter lacZ-Promotor ermöglicht ein Blau-Weiß-Screening auf X-Gal-Platten. Zur Selektion können sowohl Ampicillin als auch Kanamycin verwendet werden.
pcDNA3.1	Invitrogen Der Vektor pcDNA3.1 besitzt eine Multiklonierungsstelle mit einem vorgeschalteten CMV-Promotor. Dies ermöglicht die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen. Zur Selektion in Bakterien wird Ampicillin, in eukaryotischen Zellen Neomycin verwendet.

2.6 Antikörper

α -Maus	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper aus der Ziege (Dianova) 1 : 10 000 im Western Blot
α -CD16	Klon DJ130c-FITC aus der Maus (DAKO); 10 μ l/10 ⁶ Zellen Antikörper des <i>leucocyte typing workshop</i> N401/BL-LGL2 N402/B73.1 N403/CLB-Gran1 N404/CLB-Gran11 N405/Leu11c N406/BW209 N407/YFC120.5 N408/GRM1 N409/3G8 N410/G7E11

Material und Methoden

	N411/VEP13 je 1 $\mu\text{l}/10^6$ Zellen
α -hIgG-FITC	α -IgG-FITC aus dem Kaninchen (DAKO); 10 $\mu\text{l}/10^6$ Zellen
Negativkontrolle	5E5; unspezifischer Mausantikörper 50 $\mu\text{l}/10^6$ Zellen

2.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in destilliertem Wasser gelöst (Konzentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Name	Sequenz
PCR-NA1-1	ATG TGG CAG CTG CTC C
PCR-NA1-2	GGG AGA TCT TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TTG GTA CCC AGG TGG AG
N39Q-1	TCC CCT GAG GAC CAG TCC ACA CAG TGG
N39Q-2	CCA CTG TGT GGA CTG GTC CTC AGG GGA
N75Q-1	GGT GCC AGA CAC AGC TCT CCA CCC TC
N75Q-2	GAG GGT GGA GAG CTG TGT CTG GCA CC
N163Q-1	GGT GGG AGT AAA CAG GTG TCT TCA GAG
N163Q-2	CTC TGA AGA CAC CTG TTT ACT CCC AAC
N170Q-1	CAG AGA CTG TGC AGA TCA CCA TCA CTC
N170Q-2	GAG TGA TGG TGA TCT GCA CAG TCT CTG
CD16/5-oL	ATG CGG ACT GAA GAT CTC CC

2.8 DNA-Analysen

2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischem Maßstab (Miniprep)

2.8.1.1 Prinzip

Durch Resuspendieren der Bakterien in EDTA-haltigem Puffer werden die Zellwände der Bakterien destabilisiert. Nach diesem Schritt erfolgt eine Lyse der Zellen bei stark alkalischem pH-Wert und eine anschließende Neutralisation, bei der Proteine und chromosomale DNA zusammen mit schwerlöslichem Kalium-Dodecylsulfat kopräzipitiert werden. Die kleinen Plasmidmoleküle verbleiben bei dieser Fällung im Überstand. Sie werden durch Adsorption an eine Silica-Gelmatrix von anderen Zellbestandteilen abgetrennt.

2.8.1.2 Material

QIAprep Spin Miniprep Kit

QIAGEN

Puffer P1

Hinzufügen der mitgelieferten
RNase; Lagerung bei 4°C

Puffer P2

Puffer N3

Puffer PE

mit 100%(v/v) Ethanol nach
Vorschrift verdünnen

2.8.1.3 Durchführung

Das Sediment einer Bakterienkultur (1-5 ml LB-Medium mit 100 µg Ampicillin/ml) wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 lysiert (Inkubation maximal 5 min. bei RT). Die Fällung und Abtrennung von Proteinen und chromosomaler DNA erfolgte durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 und Zentrifugation für 10 min. bei 13 000 upm in einer Tischzentrifuge (Heraeus; Biofuge). Der erhaltene Überstand wurde auf eine QIAprep Zentrifugationssäule aufgetragen und 1 min. bei 13 000 upm zentrifugiert. Die Gelmatrix wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen und der Durchfluß durch zwei Zentrifugationsschritte sehr sorgfältig abgetrennt. Die Elution der DNA aus der Matrix erfolgte durch Auftragen

Material und Methoden

von 50 µl destilliertem Wasser, Inkubation 1 min. bei RT und Zentrifugation 1 min. bei 13 000 upm .

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab (Maxiprep)

2.8.2.1 Prinzip

Das Lysieren der Bakterienzellen und die anschließende Abtrennung von Proteinen und chromosomaler DNA erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie bei der Isolierung im analytischen Maßstab (3.8.1). Die Plasmid-DNA wird durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Matrix und eine anschließende Ethanol-Präzipitation aufgereinigt.

2.8.2.2 Material

QIAprep Maxiprep Kit

QIAGEN

Puffer P1

hinzufügen der mitgelieferten

RNase; Lagerung bei 4°C

Puffer P2

Puffer P3

Puffer QBT

Puffer QC

Puffer QF

Isopropanol 100%(v/v)

Ethanol 70%(v/v)

2.8.2.3 Durchführung

Das Sediment einer in 100 bis 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50µg/ml) gewachsenen Bakterienkultur wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 lysiert. Die Präzipitation von Proteinen und chromosomaler DNA erfolgte durch Zugabe von 10 ml Puffer P3, 20 min. Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation (30 min.,

Beckmann, JA-17-Rotor, 12 000 upm). Der erhaltene Überstand wurde auf eine (mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte) QIAGEN-500-Säule aufgetragen, die gebundene DNA mit 2x30 ml Puffer QC gewaschen und mit 15 ml Puffer QF eluiert. Anschließend erfolgte eine DNA-Präzipitation mit 10,5 ml 100%igem Isopropanol. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200µl destilliertem Wasser aufgenommen.

2.8.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

2.8.3.1 Prinzip

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäure bei 260 nm. Für die Absorption sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich.

2.8.3.2 Material

Quarzküvetten

Spectrophotometer (SHIMADZU UV-1202)

2.8.3.3 Durchführung

Die zu messende DNA-Lösung wurde mit destilliertem Wasser oder TE-Puffer 1:100 oder 1:200 verdünnt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten, da diese die UV-Strahlung nicht absorbieren. Als Leerwert für diese Messung wurde das entsprechende Verdünnungsmittel verwendet. Eine Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige DNA enthält, besitzt unter diesen Bedingungen einen Absorptionswert von 1. Da das Absorptionsmaximum für Proteine durch die enthaltenen aromatischen Reste bei 280 nm liegt, lässt sich durch Bildung des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 und 280 nm die Reinheit der Lösung bestimmen. Ein Verhältnis von 1,6-2,0 spricht für einen hohen Reinheitsgrad der DNA.

Berechnung der DNA-Konzentration:

$$c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \times 0,001$$

2.8.4 DNA-Gelelektrophorese

2.8.4.1 Prinzip

Nucleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen. Sie wandern daher im elektrischen Feld zur Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden mit Ethidiumbromid versetzte Agarose-Gele verwendet, wobei die Eigenschaft der Interkalation von Ethidiumbromid in DNA-Stränge zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente genutzt wird. Die verwendete Agarose-Konzentration der Gele ist dabei von der Größe der erwarteten Fragmente abhängig. Als DNA-Größenmarker wurden die "1 kb-Leiter" und die "100bp-Leiter" (New England Biolabs) verwendet.

2.8.4.2 Material

Agarose-Lösung	0,8-1,2%(w/v) Agarose in TAE
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml

2.8.4.3 Durchführung

Die verwendeten Agarose-Gele enthielten 5 µl der verwendeten Ethidiumbromid-Lösung auf 100 ml. Als Laufpuffer diente 1xTAE. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt. Der Lauf erfolgte bei RT und 80-100 V konstanter Spannung in der Elektrophoresekammer (BIORAD).

2.8.5 PCR-DNA- und Agarosegel-Banden-Aufreinigung

2.8.5.1 Prinzip

Bei dem verwendeten Kit wird ein chaotropes Agens zur Protein-Denaturierung eingesetzt. Die Aufreinigung der DNA erfolgt durch Bindung an eine Glasfibrermatrix. Bei der DNA-Extraktion aus Gelbanden geht der Aufreinigung ein Schritt voraus, in dem die Gelmatrix gelöst wird.

2.8.5.2 Material

GFX™ PCR-DNA and gel band purification kit Pharmacia Biotech

2.8.5.3 Durchführung

Bei der Aufreinigung von DNA aus Lösungen wurde die Lösung zunächst mit 500 µl Puffer 1 versetzt und gut gemischt. Das Gemisch wurde auf eine GFX-Säule aufgetragen (Zentrifugation: 1 min. bei 13 000 Upm in einer Tischzentrifuge), mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 50 µl Wasser eluiert.

Bei der DNA-Extraktion aus Gelbanden wurden die ausgeschnittenen Gelstücke in proportionalen Puffermengen P1 aufgenommen (10 µl Puffer/10 mg Gel). Das Auflösen der Agarosematrix erfolgte bei 60°C für etwa 5 min. Nach diesem Schritt wurde die Lösung wie oben beschrieben auf die Säule aufgetragen, gewaschen und die DNA eluiert.

2.8.6 Enzymatische DNA-Modifikation

2.8.6.1 Prinzip

Zur Klonierung und Charakterisierung von DNA werden die unterschiedlichsten Möglichkeiten der enzymatischen Modifikation genutzt. Einige Beispiele hierfür sind die Sequenz-spezifische Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonucleasen, Dephosphorylierung von DNA-5`-Enden mit Alkalischer Phosphatase, Auffüllen von überhängenden Enden oder Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase und Ligation von DNA-Fragmenten mit DNA-Ligase.

2.8.6.2 Material

Enzyme und 10xPuffer Boehringer Mannheim
New England Biolabs
Pharmacia Biotech
Stratagene

2.8.6.3 Durchführung

Die Durchführung erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in den zu den Enzymen gelieferten 10-fach Puffer-Lösungen.

2.8.7 Präparation und Transformation kompetenter Bakterien

2.8.7.1 Prinzip

Bei der Transformation werden DNA-Moleküle in entsprechend vorbereitete Bakterienzellen eingeschleust. Die zur Transformation verwendeten Zellen werden durch Vorbehandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Aufnahme von DNA empfänglich gemacht.

2.8.7.2 Material

Kalziumchloridlösung 50 mM CaCl₂

Glycerol, 100%(v/v)

2.8.7.3 Durchführung

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 250 ml LB-Medium aus einer Übernachtskultur von *Escherichia coli* angeimpft und bei 37°C und 225 upm inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 wurde die Kultur 15 min. auf Eis abgekühlt und 10 min. bei 2 500 g und 4°C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 125 ml eiskalter Kalziumchloridlösung resuspendiert, die Suspension 5 min. auf Eis inkubiert und wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter Kalziumchloridlösung resuspendiert und mit 2,9 ml Glycerol versetzt. Die Zellsuspensionen wurden in Aliquots zu 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation der kompetenten Bakterien wurden diese auf Eis aufgetaut, je 100 µl Zellsuspension mit 2-10 µl des Ligationsansatzes oder maximal 100 ng Plasmid-DNA gemischt und der Ansatz 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C und eine weitere Inkubation für 2 min. auf Eis. Danach wurden 250 µl SOC-Medium (RT) zugesetzt,

45 min. bei 37 °C und 225 upm inkubiert und auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.8.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.8.8.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*; PCR) dient zur Amplifikation von Nucleinsäuren. Die Reaktion erfolgt in mehreren Zyklen, die drei aufeinanderfolgende Schritte enthalten. Dabei wird die DNA zunächst durch Erhitzen zu Einzelsträngen denaturiert, es folgt das Anlagern kurzer Sequenzspezifischer DNA-Einzelstränge (*Primer-Annealing*) und die Amplifikation der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz durch *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase.

2.8.8.2 Material

Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)

dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Pharmacia) je 10 mM

Mineralöl (Sigma)

Thermocycler (Landgraf)

2.8.8.3 Durchführung

Für die PCR-Reaktion wurde die Ausgangs-DNA mit je 1µl der beiden Primer, 2µl dNTP-Mix und 5µl PCR-Puffer vermischt. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 49 µl aufgefüllt, 1µl Polymerase-Mix hinzugefügt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Programm:

5 min. 94°C	}	30 Zyklen
1 min. 94°C		
1 min. 56°C		
2 min. 72°C		
5 min. 72°C		
∞ bei 4°C		

2.8.9 Verknüpfungsreaktion

2.8.9.1 Prinzip

In der Verknüpfungsreaktion werden zwei DNA-Fragmente über ihre komplementären Mittelstücke miteinander fusioniert. Dabei werden die DNAs zunächst zu Einzelsträngen denaturiert, die komplementären Sequenzen in einem *Annealing*-Schritt miteinander verbunden und die fehlenden Einzelstränge von der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wird das entstandene neue Fragment mittels PCR amplifiziert.

2.8.9.2 Material

ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)

dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Pharmacia) je 10 mM

Klenow-Polymerase (Promega)

Mineralöl (Sigma)

Thermocycler (Landgraf)

2.8.9.3 Durchführung

Je 3 µl der extrahierten Ausgangsfragmente werden mit 35 µl destilliertem Wasser, 2 µl dNTP-Mix und 5 µl PCR-Puffer vermischt und 5 min. gekocht. Danach erfolgt der *Annealing*-Schritt für 20 min. bei 56°C. Nach dem Abkühlen der Reaktion wurde je 1 µl Klenow-Polymerase hinzugefügt und der Ansatz für 30 min. bei 37°C inkubiert. Zur Amplifikation des erhaltenen Fragmentes erfolgte eine PCR mit den Primer NA1.1 und NA1.2 (Protokoll s.o.).

2.9 Zellkultur-Methoden

2.9.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

2.9.1.1 Prinzip

Bei der Zell-Linie HEK293 handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen. Diese vermehren sich in der Zellkultur nur bis zum Erreichen eines vollständigen Zellrasens auf der Kunststoffoberfläche, gehen in eine stationäre Phase über und sterben nach dieser ab. Um dieses Absterben zu verhindern, müssen die Zellen in regelmäßigen Abständen von den Zellkulturschalen gelöst, verdünnt und mit neuem Medium versorgt werden. Das Ablösen der Zellen von den Schalen erfolgt hierbei durch Einwirkung von EDTA.

2.9.1.2 Material

Penicillin/Streptomycin-Lösung	10 000 U / 10 000 µg/ml
L-Glutamin-Lösung	200 mM
Medium:	DMEM/NUT Mix F12 (Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium); Gibco BRL ohne L-Glutamin, Glucosegehalt 4500mg/l, mit Phenolrot 10%(v/v) FCS 1%(v/v) Penicillin/Streptomycin 1%(v/v) L-Glutamin
EDTA-Lösung	0,1 mM EDTA in PBS

2.9.1.3 Durchführung

Beim Ausdünnen der Zellen wurde zunächst das alte Medium von den Zellen abgesaugt und 1-2 ml kalter EDTA-Lösung auf der Platte durch Schwenken verteilt. Die Zellen wurden für 2-5 min. (je nach Zell-Linie) bei RT inkubiert und durch Spülen mit 5-10 ml Medium von der Oberfläche gelöst. Anschließend wurden die

Material und Methoden

Zellen (abhängig von der Zelldichte) 1:2 bis 1:10 mit Medium ausgedünnt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte in serumhaltigem Medium bei 37°C und 5 % CO₂.

2.9.2 Kultur von NK-Zellen

2.9.2.1 Prinzip

Bei NK-Zellen handelt es sich um Zellen, die in Suspensionskultur unter Zugabe von IL-2 wachsen. Die Verwendung humaner Seren in der Kultur ermöglicht die Versorgung mit humanen Wachstumsfaktoren.

2.9.2.2 Material

Penicillin/Streptomycin-Lösung	10 000 U / 10 000 µg/ml
L-Glutamin-Lösung	200 mM
Humanes Serum von Spendern mit der Blutgruppe AB	
Medium:	RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃ ohne L-Glutamin mit Phenolrot 15% humanes AB-Serum 1%(v/v) Penicillin/Streptomycin 1%(v/v) L-Glutamin 600 U/ml IL-2 (frisch zusetzen)

2.9.2.3 Durchführung

Die NK-Zellen wurden 24-48 Stunden vor dem Testansatz aufgetaut und unter Zusatz von IL-2 (300-600U/ml) in Kultur genommen. Dabei wurden die Zellen mit einer Zelldichte von $1,5 - 2 \times 10^6$ /ml in 96-well-Platten ausgesät, um einen besseren Zell-Zell-Kontakt zu ermöglichen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂.

2.9.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

2.9.3.1 Prinzip

Das Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff ermöglicht ein langes Aufbewahren der Zellen, ohne daß diese ihre Eigenschaften verändern. Die Zellen werden dabei von der Schalenoberfläche gelöst, in einer Einfrierlösung aufgenommen und in einem Einfrierröhrchen langsam eingefroren.

Das Auftauen eingefrorener Zellen sollte schnell erfolgen. Die vor dem Einfrieren zugesetzte Lösung muß durch mehrmaliges Waschen der Zellen entfernt werden.

2.9.3.2 Material

Einfrierlösung

FCS mit 10%(v/v) DMSO

2.9.3.3 Durchführung

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen durch Einwirkung von 1 ml EDTA-Lösung pro Schale von der Oberfläche gelöst und in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden pelletiert, in 1 ml Einfrierlösung resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst langsam eingefroren und über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Die endgültige Lagerung erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut. Um das Dimethylsulfoxid zu entfernen, wurden die Zellen pelletiert und mit 5 ml Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in eine Zellkulturflasche gegeben.

2.9.4 Ermittlung der Zellzahl

2.9.4.1 Prinzip

Die Zählung der Zellen erfolgt in einer Zählkammer nach Neubauer. Das ausgezählte Volumen entspricht dabei 0,1 μl pro ausgezähltem Eckquadrat. Von diesem Volumen ausgehend wird die Zellzahl in 1 ml berechnet. Zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen wird die Suspension mit einer Trypanblau-Lösung vermischt, da der Farbstoff nur von toten Zellen aufgenommen wird.

2.9.4.2 Material

Neubauer Zählkammer mit Deckglas

PBS mit 1%(v/v) Trypanblau

2.9.4.3 Durchführung

Adhärente Zellen wurden mit 1 ml EDTA-Lösung pro Zellkulturschale von der Oberfläche abgelöst und in 2-5 ml Medium aufgenommen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:2 mit der Trypanblau-Lösung vermischt und in eine mit Deckglas versehene Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden zwei große Eckquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Medium ergab sich aus der Gesamtanzahl Zellen in den ausgezählten Quadraten multipliziert mit 10^4 .

2.9.5 FACS-Analyse

2.9.5.1 Prinzip

In der FACS-Analyse wird die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche gemessen. Dabei werden die Zellen mit einem spezifischen Primärantikörper gegen das gewünschte Protein inkubiert. Durch einen, gegen den Primärantikörper gerichteten, sekundären Antikörper mit Fluoreszenzmarkierung werden die Oberflächenproteine für die Analyse sichtbar gemacht. Im Zytofluorometer wird zunächst das nach vorn (FSC= forward light scatter) und das um 90° (SSC = sideward light scatter) gestreute Licht gemessen. Die entstehende Streuung ist Zelltyp-spezifisch. Dabei wird das Signal des FSC hauptsächlich durch

die Zellgröße und das des SSC durch die Granularität der Zelle bestimmt. Bei der eigentlichen Fluoreszenzanalyse werden die einzelnen Zellen durch einen Laser angeregt und an elektronischen Detektoren vorbeigeführt, die die Fluoreszenzintensität der Zelle registrieren.

2.9.5.2 Material

Waschlösung	PBS 0,1%(w/v) BSA 0,05%(v/v) Natriumazid
FacsCalibur	Becton Dickinson

2.9.5.3 Durchführung

Für die Durchflußzytometrie wurden in der Regel 10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Zellen wurden in Vertiefungen einer 96-Loch-Platte gegeben und mit PBS/BSA/ NaN_3 gewaschen. Anschließend wurde die vom Hersteller angegebene Antikörpermenge hinzugegeben und die Ansätze wurden 20-30 min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit Waschlösung gewaschen und gegebenenfalls mit einem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper für weitere 20 min. bei 4°C inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Zellen in $200\mu\text{l}$ PBS/BSA/ NaN_3 resuspendiert und die Fluoreszenz im FacsCalibur bestimmt.

2.9.6 Stabile Transfektion

2.9.6.1 Prinzip

Als Transfektion werden Verfahren bezeichnet, die zur Einschleusung von DNA in eukaryote Zellen dienen. Bei Versuchen, bei denen die DNA nicht ins Wirtsgenom integriert wird und somit im Laufe mehrerer Zellteilungen wieder verloren geht, spricht man von transienter Transfektion im Gegensatz zur stabilen Transfektion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die stabilen Transfektionen mit einem aktivierten Dendrimer als DNA-Träger durchgeführt. Bei dieser Methode wird die DNA in die Dendrimer-Struktur eingebunden. Der erhaltene Komplex besitzt eine positive Nettoladung, durch die eine Anlagerung an negativ geladene

Material und Methoden

Rezeptoren der Zelle ermöglicht wird. Nach der erfolgten Endozytose durch die Zelle führt das Transfektionsreagenz zu einer pH-Inhibition der lysosomalen Nukleasen.

2.9.6.2 Material

Medium ohne Zusätze	DMEM/NUT Mix F12 (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium); Gibco BRL ohne L-Glutamin, Glucosegehalt 4500mg/l, mit Phenolrot
Kulturmedium mit Zusätzen	DMEM/NUT Mix F12 (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium); Gibco BRL ohne L-Glutamin, Glucosegehalt 4500mg/l, mit Phenolrot 10%(v/v) FCS 1%(v/v) Penicillin/Streptomycin 1%(v/v) L-Glutamin
<i>SuperFect Transfection Reagent</i>	QIAGEN
Zellkulturschalen mit 60 mm Durchmesser	
24-well-Platten	

2.9.6.3 Durchführung

Am Tag vor der Transfektion wurden die verwendeten Zellen mit $3-5 \times 10^5$ Zellen/well einer 60mm-Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Für die Transfektion wurden 5 µg DNA mit 150 µl Medium ohne Zusätze vermischt und 20 µl des *SuperFect Transfection Reagent* hinzugefügt. Um eine vollständige Durchmischung der DNA mit dem Reagenz zu erreichen, wurde die Lösung 10 s auf einem Vortex-Gerät geschüttelt und 5-10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, 1000 µl

Material und Methoden

Medium mit Zusätzen zu dem Transfektionsansatz gegeben und nach zweimaligem Durchmischen mit der Pipette vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Inkubation erfolgte 24-48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂.

Zur Selektion wurden die Zellen 1:10 mit dem Selektionsmedium vermischt und auf 24-*well*-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation über 14 Tage unter Selektionsdruck konnte die Proteinexpression an der Oberfläche der wachsenden Zellen in der Durchflusszytometrie bestimmt werden.

2.9.7 IgG-Bindungsassay

2.9.7.1 Prinzip

Bei diesem Assay wird die Bindung von humanem IgG an Oberflächen-Rezeptoren durchflußzytometrisch bestimmt. Dazu werden Zellkultur- oder Patientenzellen mit IgG inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Detektion der gebundenen IgG-Moleküle durch einen gegen IgG gerichteten monoklonalen Antikörper (FITC-gekoppelt) dessen Fluoreszenz im Durchflußzytometer bestimmt werden kann.

2.9.7.2 Material

Octagam (humanes Immunglobulin G)	Octapharma GmbH
α -hIgG-FITC	α -IgG-FITC aus dem Kaninchen (DAKO); 10 μ l/10 ⁶ Zellen

2.9.7.3 Durchführung

Für diesen Versuchsansatz wurden 1-5x10⁵ Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Zellen wurden in Vertiefungen einer 96-*well*-Platte gegeben und mit PBS/BSA/NaN₃ gewaschen. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen Octagam (humanes IgG) hinzugegeben und die Ansätze 20-30 min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit Waschlösung gewaschen und mit einem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper für weitere 20 min. bei 4°C inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 200 μ l PBS/BSA/NaN₃ resuspendiert und im FacsCalibur analysiert.

2.9.8 Tunicamycin-Assay

2.9.8.1 Prinzip

In diesen Tests wurde Tunicamycin als deglycosylierendes Agens eingesetzt. Diese Substanz, die aus verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen gewonnen wird, blockiert die Bildung von N-Glycosylierungen durch Inhibition des Transfers von N-Acetylglucosamin-1-Phosphat auf Dolichol-Monophosphat. Durch die Blockade dieses ersten Schrittes der N-Glycosylierung wird der Aufbau von Zuckerbäumen am Asparagin verhindert.

2.9.8.2 Material

Kultur-Medium:	DMEM/NUT Mix F12 (Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium); Gibco BRL ohne L-Glutamin, Glucosegehalt 4500mg/l, mit Phenolrot 10%(v/v) FCS 1%(v/v) Penicillin/Streptomycin 1%(v/v) L-Glutamin
NK-Zell-Medium:	RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃ ohne L-Glutamin mit Phenolrot 15% humanes AB-Serum 1%(v/v) Penicillin/Streptomycin 1%(v/v) L-Glutamin 600 U/ml IL-2 (frisch zusetzen)
Tunicamycin-Lösung	1 mg/ml; Sigma

2.9.8.3 Durchführung

Material und Methoden

In den Ansätzen des Tunicamycin-Assays wurde das entsprechende Zellkulturmedium mit 1-2 µg/ml Tunicamycin versetzt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/ml in 96-*well*- oder 24-*well*-Platten kultiviert. Nach 30 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen hinsichtlich ihrer CD16-Expression und IgG-Bindung untersucht.

2.9.9 Dexamethason-Assay

2.9.9.1 Prinzip

In diesen Experimenten wurde das Kortison-Präparat Dexamethason eingesetzt, um seinen Einfluß auf die Expression von CD16 und die IgG-Bindung zu untersuchen. Kortison wird der Gruppe der Glucocorticoide (Steroidhormone der Nebennierenrinde) zugeordnet. Die Wirkung dieser Substanzen auf die Zelle wird in genomische und nicht-genomische Effekte unterteilt. Die genomische Wirkung wird über spezifische Rezeptoren der Zielzellen vermittelt und führt zur veränderten Expression verschiedener Zielgene. Bei den nicht-genomischen Wirkungen von Corticoiden findet eine Interaktion mit Molekülen der Zellmembran statt. Hierbei kommt es zu einer Änderung der Membraneigenschaften: erhöhte Stabilität und verminderte Permeabilität.

2.9.9.2 Material

NK-Zell-Medium:	RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃ ohne L-Glutamin mit Phenolrot 15% humanes AB-Serum 1%(v/v) Penicillin/Streptomycin 1%(v/v) L-Glutamin 600 U/ml IL-2 (frisch zusetzen)
Fortecortin	4 mg/ml Dexamethason (Merck)

2.9.9.3 Durchführung

Material und Methoden

In den Ansätzen des Dexamethason-Assays wurde das NK-Zell-Medium mit 4µg/ml Fortecortin (Dexamethason) versetzt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ in 96-well-Platten in Kultur genommen. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Expression von CD16 und die Bindung von IgG an die Zelle untersucht.

2.9.10 Zytotoxizitäts-Assay

2.9.10.1 Prinzip

Der Zytotoxizitäts-Assay dient als Funktionstest zur Untersuchung von zytotoxischen Effektorzellen. NK-Zellen sind in der Lage, Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen als körperfremd zu erkennen und zu lysieren. Im Gegensatz zu anderen Zell-vermittelten Mechanismen bedarf es keiner vorhergehenden Sensibilisierung der Zelle. Zur Induktion der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität werden die Zielzellen vor der Inkubation mit einem Antikörper gegen diese Targets beschichtet. Im Zytotoxizitäts-Assay werden radioaktiv-markierte Zielzellen (Targets) mit den NK-Zellen (Effektoren) inkubiert und die Lyserate der Zielzellen anhand der freigesetzten Radioaktivität im Überstand bestimmt.

2.9.10.2 Material

Target-Zell-Medium:	RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃ ohne L-Glutamin mit Phenolrot 10% FCS 1%(v/v) Penicillin/Streptomycin 1%(v/v) L-Glutamin
Target-Zellen: K562	humane erythromyeloide Zell-Linie, wird zur Untersuchung des direkten Killings genutzt
L1210	murine Tumor-Zell-Linie, im direkten Killing negativ, wird zur Bestimmung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität verwendet

Material und Methoden

ADCC-Antikörper	α L1210 aus dem Kaninchen (1:2000)
51 Chrom	100 μ Ci/Zell-Linie

2.9.10.3 Durchführung

Vor dem Testansatz wurden die Zellen mit frischem RPMI gewaschen, pelletiert, das Zellpellet mit 100 μ Ci 51 Chrom versetzt und für 60 min. bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und auf 10^5 Zellen/ml Medium eingestellt. Für die Untersuchung der ADCC wurde ein Target-spezifischer Antikörper (α L1210) auf die Zellen gegeben, der Ansatz 30 min. bei 37°C inkubiert und freie Antikörper durch mehrere Waschschrte entfernt. Im Test wurden 50 μ l der Zellsuspension (= 5000 Zellen) pro Ansatz eingesetzt. Die Effektor-Zellen wurden gewaschen und auf 3×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt. Aus einer Verdünnungsreihe entstanden vier verschiedene Effektor-Target-Relationen (E:T-Ratio) in einem Endvolumen von je 150 μ l: 100 μ l Zell-Suspension = 300 000 Effektoren (60:1), 50 μ l = 150 000 (30:1), 25 μ l = 75 000 (15:1) und 12,5 μ l = 37 500 (7,5:1). Zur Bestimmung der spontanen Freisetzung wurden Ansätze mit Targetzellen ohne Effektoren verwendet, zur Analyse der maximalen Freisetzung wurden die Zellen mit 1% Triton-X lysiert. Die Zellen wurden gemischt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und 75 μ l des Überstandes für die Radioaktivitätsbestimmung im γ -Counter eingesetzt.

Die spezifische Lyse wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{spez. Lyse} = \frac{\text{spez. Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}{\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}$$

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung der CD16-Konstrukte

3.1.1 PCR-Mutagenese

Die cDNA des NA1-Allels von CD16B (der GPI-verankerten Form des Moleküls) codiert für vier Asparagin-(N)-Glycosylierungsstellen, je zwei in der Membran-distalen Domäne I (N39 und N75) und der Membran-proximalen Domäne II (N163 und N170). Um den Einfluß und die Funktion dieser Glycosylierungsstellen untersuchen zu können, wurden diese einzeln zu Glutamin (Q) mutiert. Als Ausgangs-DNA für diese PCR-Mutagenese diente Wildtyp CD16B-NA1 in dem Vektor pcDNA3.1. Die Mutagenese an den markierten Bereichen der Sequenz (Abb. 3) erfolgte in drei Schritten: 1.) PCR der einzelnen kurzen PCR-Fragmente 2.) Verknüpfung der beiden jeweiligen Fragmente über die komplementären Enden im Bereich der Mutation und Auffüllen mit Klenow-Polymerase 3.) Amplifikation durch eine PCR mit den Randprimern NA1.1 und NA1.2. Die erhaltenen Fragmente wurden über die TA-Klonierungsstelle in den pCR2.1-Vektor kloniert und sequenziert, um die richtige Mutation zu bestätigen und zusätzliche Mutationen durch Lesefehler der Polymerase auszuschließen. Die einzelnen veränderten DNA-Sequenzen sind in Tabelle 1 im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz angegeben.

TCT	TTG	GTG	ACT	TGT	CCA	CTC	CAG	TGT	GGC	ATC	ATG	TGG	CAG	CTG	45
											M	W	Q	L	
CTC	CTC	CCA	ACT	GCT	CTG	CTA	CTT	CTA	GTT	TCA	GCT	GGC	ATG	CGG	90
L	L	P	T	A	L	L	L	L	V	S	A	G	M	R	
ACT	GAA	GAT	CTC	CCA	AAG	GCT	GTG	GTG	TTC	CTG	GAG	CCT	CAA	TGG	135
T	E	D	L	P	K	A	V	V	F	L	E	P	Q	W	
TAC	AGC	GTG	CTT	GAG	AAG	GAC	AGT	GTG	ACT	CTG	AAG	TGC	CAG	GGA	180
Y	R	V	L	E	K	D	S	V	T	L	K	C	Q	G	
GCC	TAC	TCC	CCT	GAG	GAC	AAT	TCC	ACA	CAG	TGG	TTT	CAC	AGT	GAG	225
A	Y	S	P	E	D	N	S	T	Q	W	F	H	N	E	
ATC	CTC	ATC	TCA	AGC	CAG	GCC	TCG	AGC	TAC	TTC	ATT	GAC	GCT	GCC	270
N	L	I	S	S	Q	A	S	S	Y	F	I	D	A	A	
ACA	GTC	AAC	GAC	AGT	GGA	GAG	TAC	AGG	TGC	CAG	ACA	AAC	CTC	TCC	315
T	V	D	D	S	G	E	Y	R	C	Q	T	N	L	S	
ACC	CTC	AGT	GAC	CCG	GTG	CAG	CTA	GAA	GTC	CAT	ATC	GGC	TGG	CTG	360
T	L	S	D	P	V	Q	L	E	V	H	V	G	W	L	

Ergebnisse

```

TTG CTC CAG GCC CCT CGG TGG GTG TTC AAG GAG GAA GAC CCT ATT 405
L L Q A P R W V F K E E D P I

CAC CTG AGG TGT CAC AGC TGG AAG AAC ACT GCT CTG CAT AAG GTC 450
H L R C H S W K N T A L H K V

ACA TAT TTA CAG AAT GGC AAA GAC AGG AAG TAT TTT CAT CAT AAT 495
T Y L Q N G K Q R K Y F H H N

TCT GAC TTC CAC ATT CCA AAA GCC ACA CTC AAA GAT AGC GGC TCC 540
S D F H I P K A T L K D S G S

TAC TTC TGC AGG GGG CTT GTT GGG AGT AAA AAT GTG TCT TCA GAG 585
Y F C R G L V G S K N V S S E

ACT GTG AAC ATC ACC ATC ACT CAA GGT TTG GCA GTG TCA ACC ATC 630
T V N I T I T Q G L L V S T I

TCA TCA TTC TCT CCA CCT GGG TAC CAA GTC TCT TTC TGC TTG GTG 675
S S E S P P G Y Q V S F C L V

ATG GTA CTC CTT TTT GCA GTG GAC ACA GGA CTA TAT TTC TCT GTG 720
M V L L F A V D T G L Y F S V

AAG ACA AAC ATT TGA AGC TCA ACA AGA GAC TGG AAG GAC CAT AAA 765
K T N I -

CTT AAA TGG AGA AAG GAC CCT CAA GAC AAA TGA CCC CCA TCC CAT 810

GGG AGT AAT AAG AGC AGT GGC AGC AGC ATC TCT GAA CAT TTC TCT 855

GGA TTT GCA ACC CCA TCA TCC TCA GGC CTC TC

```

Abbildung 3: Sequenz der cDNA von CD16B NA1

Die abgebildete cDNA-Sequenz enthält den gesamten codierenden Bereich sowie Teile der 3'- und 5'-untranslatierten Regionen des NA1-Allels von CD16B. Die potentiellen N-Glycosylierungsstellen des Proteins sind durch Fettdruck hervorgehoben.

DNA	mutierte DNA-Bereiche			
	196-204	304-312	567-575	589-597
WT-CD16	-GACAATTC-	-ACAAACCTC-	-AAAAATGTG-	-GTGAACATC-
N39Q	-GACC AG TCC-			
N75Q		-ACAC AG GCTC-		
N163Q			-AAAC AG GTG-	
N170Q				-GTGC AG ATC-

Tabelle 1: mutierte DNA-Sequenzen

Diese Tabelle zeigt die mutierten DNA-Sequenzen im Vergleich zu Wildtyp-CD16. Die unterstrichenen DNA-Bereiche markieren das veränderte Triplet, das nach der Mutagenese für Glutamin codiert. Leere Felder bedeuten eine unveränderte Sequenz in dem jeweiligen DNA-Abschnitt.

3.1.2 Klonierung der mutierten DNAs an die GPI-Verankerungssequenz

In diesem Schritt wurde die Wildtyp-Sequenz in dem Ausgangsplasmid CD16B-NA1-pcDNA3.1 gegen die mutierten Sequenzen ausgetauscht. Ein zusätzlicher Schnitt innerhalb des Ampicillin-Resistenzgens und eine Ligation aus drei Fragmenten sollte eine Religation der Wildtyp-DNA verhindern. Die Selektion positiver Klone erfolgte mit Ampicillin. Mit einem BamHI/KpnI-Kontrollverdau wurde die Mutanten-Insertion und mit der anschließenden Sequenzierung die korrekte Anknüpfung an die Verankerungssequenz überprüft. Eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 4 dargestellt.

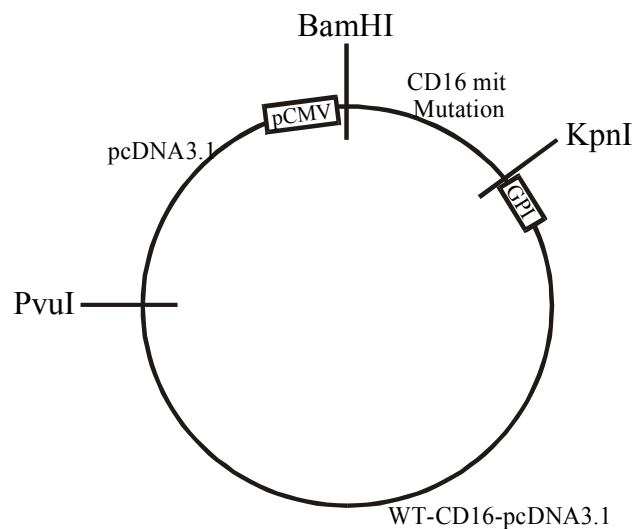


Abbildung 4: Verknüpfung mit der GPI-Verankerungssequenz in pcDNA3.1

Die mutierte DNA-Sequenz wurde in einer Drei-Fragmente-Ligation zwischen den CMV-Promotor des pcDNA3.1-Vektors und die GPI-Verankerungssequenz von CD16B-NA1-Wildtyp kloniert.

Der Vektor pcDNA3.1 besitzt eine Multiklonierungsstelle mit einem vorgeschalteten CMV-Promotor. Dies ermöglicht die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen. Eine *Leader*-Sequenz am Anfang des Proteins ist für die Synthese in das Endoplasmatische Retikulum und den Transport zur Zelloberfläche verantwortlich. Die Anknüpfung des Rezeptors an die Zellmembran erfolgt über einen GPI-Anker.

3.2 Transfektion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß der einzelnen Glycosylierungsstellen auf die Funktion von CD16B-NA1 untersucht werden. Dazu wurden Säugetierzellen (HEK293) mit den erhaltenen mutierten DNAs N39Q, N75Q, N163Q, N170Q und der unmutierten DNA WT-CD16B-NA1 stabil transfiziert. Nach 14 Tagen Selektion mit G418 wurden die Zellen durchflußzytometrisch auf die Expression von CD16 hin untersucht. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 5 dargestellt. In diesem Versuch konnte bei allen transfizierten Zellen eine Expression von CD16 >95% gemessen werden. Die dabei erhaltene Rezeptordichte auf der Zelloberfläche war über mehrere Wochen stabil.

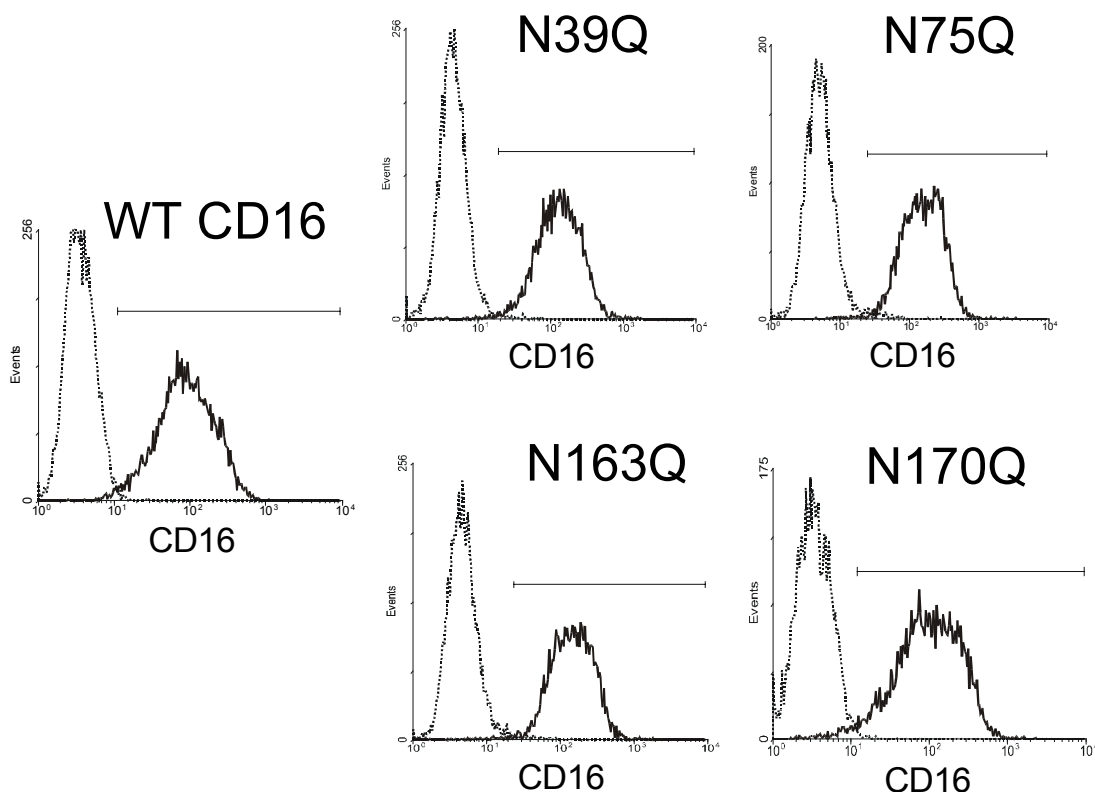


Abbildung 5: Stabile Expression der verschiedenen CD16-DNAs

Je 8×10^5 Zellen wurden mit $20 \mu\text{g}$ WT-CD16, N39Q, N75Q, N163Q oder N170Q transfiziert. Nach 14 Tagen in Kulturmedium mit $750 \mu\text{g/ml}$ G418 wurden die Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit dem monoklonalen Mausantikörper CLB-Gran1 und GAM-FITC markiert und im Durchflußzytometer untersucht. Die durchgehenden Linien zeigen die transfizierten Zellen im Unterschied zu untransfizierten Zellen (unterbrochene Linien).

3.3 Epitop-mapping

Einzelne Austausche von Aminosäuren an entsprechenden Schlüsselstellen des Proteins können zu starken Variationen der Proteinstruktur führen. In diesem Versuch sollten solche schwerwiegenden Veränderungen ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern vorinkubiert, die gegen verschiedene Bereiche des Proteins gerichtet waren, und anschließend durchflußzytometrisch untersucht. Die Auswertung erfolgte durch Standardisierung der erhaltenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) mit dem als Referenz gewählten Antikörper CLB-Gran1, dessen MFI-Werte der jeweiligen Messungen als 100% gesetzt wurden. In Abbildung 6 sind die nach Standardisierung erhaltenen Werte dargestellt.

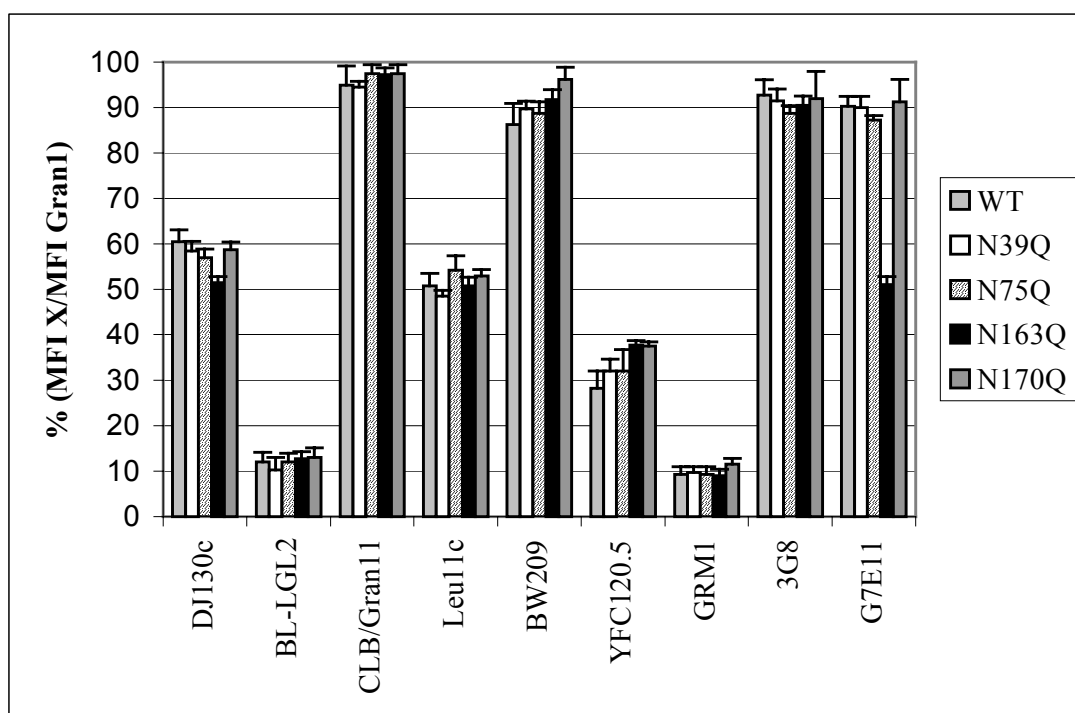


Abbildung 6: Epitop-mapping der transfizierten Zell-Linien

Die mit WT-CD16-, N39Q-, N75Q-, N163Q- oder N170Q-DNA transfizierten Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern gegen CD16 und GAM-FITC markiert und im Durchflußzytometer untersucht. Der Antikörper mit den höchsten gemessenen Fluoreszenzintensitäten (CLB/Gran1) wurde als Referenz gewählt, um den Vergleich verschiedener Messungen zu gewährleisten.

Die einzelnen Antikörper zeigten unterschiedlich starke Bindung an die transfizierten Zellen. Die schwächste Bindung erfolgte bei den Antikörpern BL-LGL2 und GRM1. Im Falle des Antikörpers GRM1 war eine Spezifität für das NA2-Allel von CD16 bekannt. Im Vergleich der verschiedenen transfizierten Linien konnte nur ein Unterschied festgestellt werden. Im Falle der Mutation N163Q zeigte

der Antikörper G7E11 eine deutlich reduzierte Bindungsintensität. Die Bindungskurven dieses Antikörpers sind exemplarisch in Abbildung 7 gezeigt. Die Bindungsstelle für diesen Antikörper scheint im Bereich der mutierten Aminosäuresequenz N163Q und damit im Bereich der IgG-Bindungsstelle zu liegen.

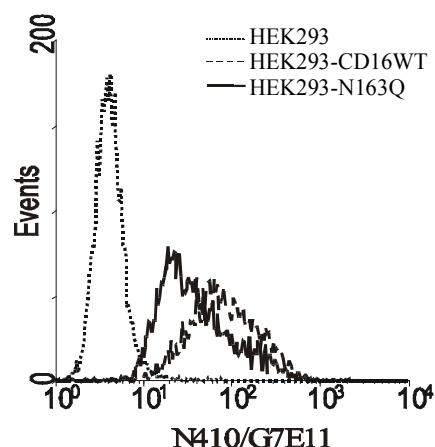


Abbildung 7: Bindung des Antikörpers G7E11

Diese Abbildung zeigt die Bindung des monoklonalen Antikörpers G7E11 an die transfizierten Zellen CD16-WT (-----) im Vergleich zu N163Q (——). Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293 eingesetzt (.....). Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Antikörper vorinkubiert und die Bindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Da sich die Bindungsstelle des Antikörpers N410/G7E11 innerhalb der IgG-Bindungsstelle befindet, und die Antikörper-Bindung Glycosylierungs-abhängig ist, wurde dieser monoklonale Antikörper gewählt, um auf peripheren Blutlymphozyten (PBL) die unterschiedliche Glycosylierung sichtbar zu machen. Für diese Untersuchungen wurden Lymphozyten verschiedener Blutspender und Patienten aus dem Vollblut isoliert und die Bindung des Antikörpers G7E11 mit der Referenz CLB-Gran1 verglichen (Abbildung 8). Eine unterschiedliche Bindung von G7E11 bei Patienten mit verschiedenen immunologischen Erkrankungen und gesunden Kontrollspendern würde Rückschlüsse auf eine veränderte Glycosylierung innerhalb der IgG-Bindungsstelle des Fc γ RIIIB ermöglichen.

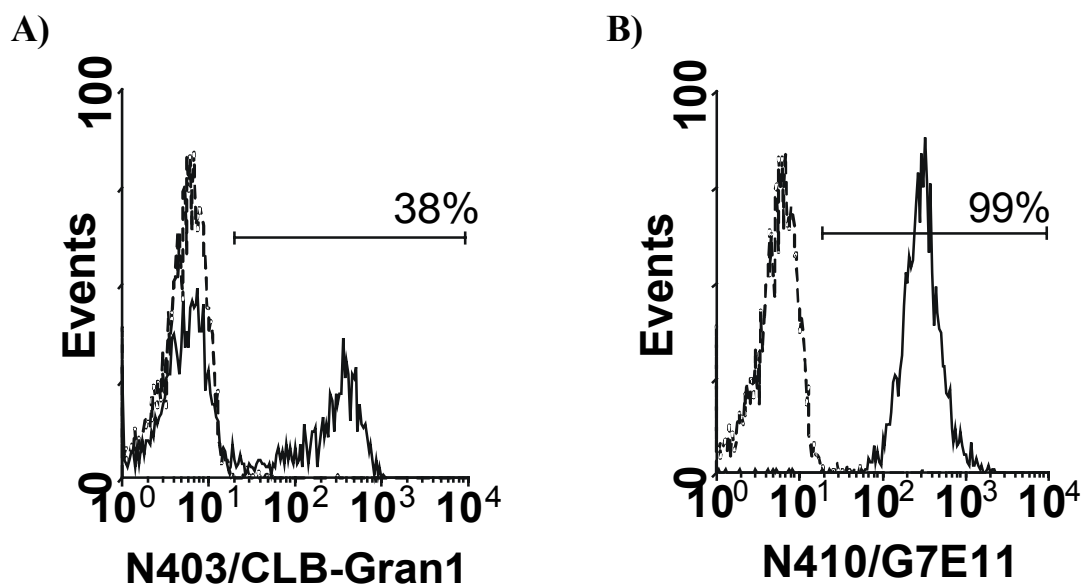


Abbildung 8: Bindung des mAB G7E11 an PBL

Gezeigt ist die Bindung der beiden monoklonalen Antikörper CLB-Gran1 (A) und G7E11 (B) auf Blutlymphozyten. Die Zellen wurden aus dem Vollblut isoliert, mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und die Antikörper-Bindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper für die FACS-Analyse sichtbar gemacht. In beiden Histogrammen wurde die Fluoreszenz des CD16-Antikörpers mit einer Negativkontrolle (-----) verglichen.

Die Analyse der Ergebnisse der G7E11-Bindungsstudie auf Lymphozyten ergab bei dem gewählten Kontrollspender eine Bindung des Referenzantikörpers CLB-Gran1 auf 38% der Zellen. Aufgrund der Ergebnisse der Messungen mit transfizierten Zellen wurde eine Bindung des G7E11-Antikörpers auf der gleichen Zellzahl aber mit verminderter Intensität erwartet. In den folgenden Messungen mit G7E11 wurde bei allen Blutproben eine Bindung >99% erreicht. Durch die gleichmäßige Bindung an alle Zelltypen und vorhergehende Studien anderer Arbeitsgruppen wurde eine Kreuzreaktion des Antikörpers G7E11 mit HLA Klasse I Antigenen vermutet (Uciechowski *et al.*, 1989). Durch diese Kreuzreaktion ist eine Verwendung des Antikörpers G7E11 als Marker der Glycosylierung von Rezeptoren auf humanen Blutzellen ausgeschlossen.

In weiteren Experimenten sollte gezeigt werden, daß die unterschiedliche Bindung von G7E11 an die verschiedenen transfizierten Zell-Linien auf die veränderten Fc-Rezeptoren und nicht auf die Expression von HLA Klasse I zurückzuführen ist. Dazu wurde die Expression von HLA Klasse I-Molekülen auf transfizierten und untransfizierten HEK293-Zellen mittels eines direkt markierten Antikörpers in der Fluoreszenzanalyse bestimmt (Abbildung 9).

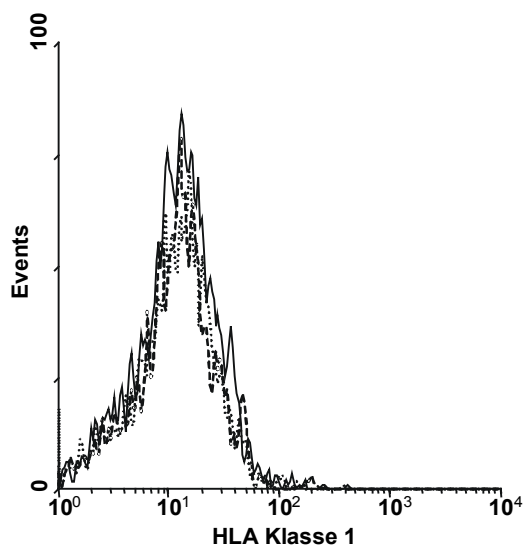


Abbildung 9: Expression von HLA Klasse 1 auf HEK293

Für diesen Test wurden untransfizierte HEK293-Zellen (·····), CD16-WT(----) und N163Q-transfizierte (—) Zellen mit einem direkt-markierten Antikörper gegen HLA Klasse 1 inkubiert und die Fluoreszenz in der FACS-Analyse bestimmt.

Dieses Experiment zeigte, daß weder auf den untransfizierten HEK293 noch auf den transfizierten Zellen HLA Klasse 1-Moleküle exprimiert werden. Eine unterschiedliche Expression oder Induktion der Expression auf verschiedenen Zell-Linien konnte ausgeschlossen werden. Dadurch wurde deutlich, daß die Expression von HLA-Molekülen im Falle der transfizierten Zellen keinen Einfluß auf die Bindung des Antikörpers G7E11 hatte. Die Bindungsunterschiede bei den verschiedenen Zell-Linien waren ausschließlich auf die unterschiedlichen Mutationen der FcγRIII-Rezeptoren zurückzuführen.

3.4 Kontrolle der FcγR-Expression auf transfizierten Zellen

In den folgenden Experimenten sollte die funktionale Rolle der Glycosylierung des FcγRIII anhand der Bindung von humanem IgG untersucht werden. Da auch die anderen FcγR in der Lage sind, IgG zu binden, war ein Ausschluß der Expression von FcγRI und RII auf der Oberfläche der transfizierten Zellen essentiell. In diesem Versuchsansatz wurde die Expression von CD64 (FcγRI), CD32 (FcγRII) und CD16 (FcγRIII) auf untransfizierten und transfizierten Zellen (am Beispiel der Linie HEK293-CD16WT) verglichen (Abbildung 10). Dazu wurden die Zellen mit FITC-Antikörpern gegen die verschiedenen Rezeptoren inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht. Die verschiedenen Zell-Linien zeigten keine Expression der Rezeptoren FcγRI und FcγRII. Der Rezeptor FcγRIII war nur auf den transfizierten Zellen vorhanden. Diese Ergebnisse ermöglichten den Ausschluß undefinierter IgG-Bindung an verschiedene Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

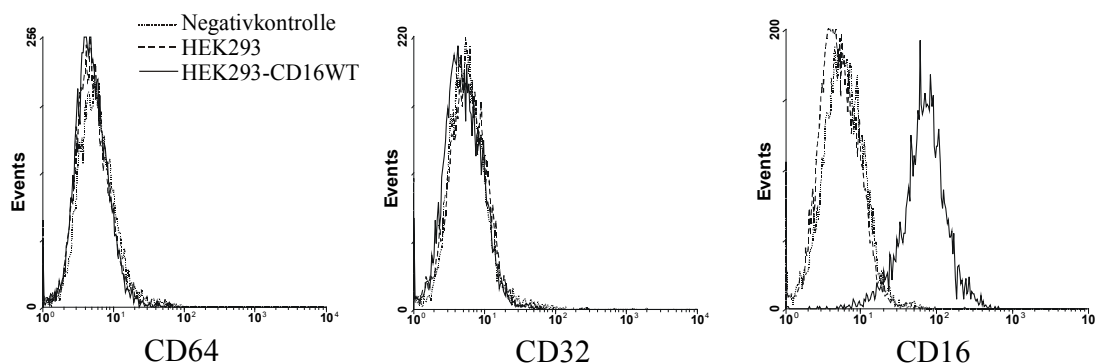


Abbildung 10: Expression verschiedener Fc γ -Rezeptoren auf CD16-transfizierten Zellen

Die Histogramme zeigen den Vergleich der Expression der Fc γ -Rezeptoren I, II und III auf transfizierten und untransfizierten Zellen. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen die verschiedenen Rezeptoren inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht.

3.5 Bindung von humanem monomerem IgG

Zur Untersuchung der Funktion der mutierten Fc γ -Rezeptoren wurden IgG-Bindungsassays durchgeführt. In diesen Assays wurde die Bindung von monomerem humanem IgG an die verschiedenen transfizierten HEK293-Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des IgG1 vorinkubiert und die gebundene Antikörpermenge durch einen gegen IgG gerichteten Sekundärantikörper (FITC-gekoppelt) sichtbar gemacht. In Abbildung 11 sind die Bindungskurven verschiedener Zell-Linien gezeigt.

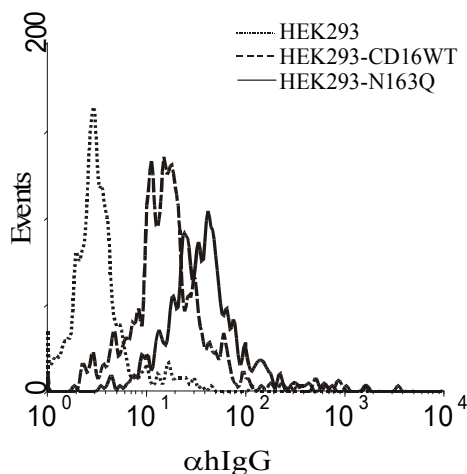


Abbildung 11: IgG-Bindung an CD16-transfizierte Zellen

Das Histogramm zeigt die Bindung von humanem IgG an die transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten HEK293 (.....). Dargestellt ist außerdem der Vergleich der beiden Rezeptoren CD16-WT (-----) und N163Q (—) bezogen auf die IgG-Bindung. Für die Messungen wurden die Zellen mit 50 μ g humanem IgG1 vorinkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem FITC-markierten anti-hIgG in der Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht.

Ergebnisse

Die ausgewählten Zell-Linien zeigten eine deutliche Bindung des humanen IgG. Dabei trat ein Unterschied in den Bindungsintensitäten zwischen den einzelnen mutierten Rezeptoren auf: Es erfolgte eine stärkere IgG-Bindung an den mutierten Rezeptor N163Q verglichen mit dem Wildtyp-Rezeptor und den anderen Mutanten.

Durch Standardisierung der erhaltenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) mit dem als Referenz gewählten Antikörper CLB-Gran1 (MFI=100%) wurden eventuelle Effekte durch unterschiedliche Expressionsdichten der CD16-transfizierten Zellen in verschiedenen Experimenten ausgeschlossen. In Abbildung 12 sind die nach Standardisierung erhaltenen Werte gezeigt.

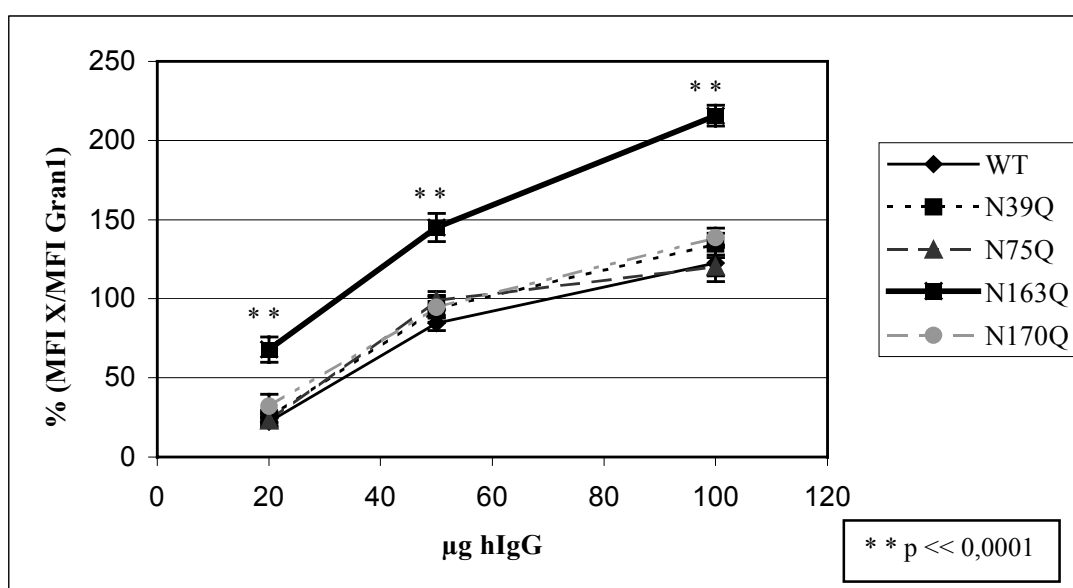


Abbildung 12: Bindung von humanem IgG an CD16-transfizierte Zellen

Die mit WT-CD16-, N39Q-, N75Q-, N163Q- oder N170Q-DNA transfizierten Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monomeren humanen IgG vorinkubiert (0, 20, 50 und 100 µg). Die gebundene Antikörpermenge wurde durch einen FITC-gekoppelten anti-hIgG in der Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht. Der CD16-Antikörper mit den höchsten gemessenen Fluoreszenzintensitäten (CLB/Gran1) wurde als Referenz gewählt, um den Vergleich verschiedener Messungen zu gewährleisten.

In allen IgG-Bindungsassays war ein deutlicher Unterschied in der IgG-Bindung der Mutante N163Q im Vergleich zu den anderen Mutanten und dem Wildtyp-Rezeptor sichtbar. Die transfizierten Zellen mit dem mutierten Rezeptor N163Q, dessen ausgeschaltete Glycosylierungsstelle im Bereich der IgG-Bindungsdomäne liegt, zeigten eine signifikant verstärkte Bindung des monomeren IgGs. Diese Verstärkung trat in allen untersuchten IgG-Konzentration auf. Zwischen den anderen mutierten Rezeptoren und den CD16-Wildtyp-transfizierten Zellen war kein Unterschied festzustellen.

3.6 Einfluß der Deglycosylierung der Fc γ -Rezeptoren auf transfizierten Zellen

In den IgG-Bindungsassays mit den CD16-transfizierten Zellen zeigte sich eine verstärkte Bindung von monomerem IgG an transfizierte Zellen, bei deren Fc γ -Rezeptoren die Glycosylierungsstelle Asparagin 163 zu Glutamin mutiert wurde. Diese Aminosäure befindet sich innerhalb der Bindungsdomäne für IgG. Durch die Mutation zu Glutamin wird eine Glycosylierung an dieser Stelle verhindert. In den folgenden Experimenten wurde Tunicamycin als deglycosylierendes Agens eingesetzt. Diese Substanz, die aus verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen gewonnen wird, blockiert die Bildung von N-Glycosylierungen durch Inhibition des Transfers von N-Acetylglucosamin-1-Phosphat auf Dolichol-Monophosphat. Durch Inkubation der transfizierten Zellen mit Tunicamycin wird die Bildung von Zuckerbäumen an allen vier Glycosylierungsstellen (auch an Asparagin N163) verhindert. In diesem Experiment wurde die Bindung von IgG an die WT-CD16- und N163Q-transfizierten Zellen mit und ohne Einsatz von Tunicamycin untersucht.

Die transfizierten Zellen zeigten eine deutliche Expression des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche, die auch nach einer mehrtägigen Kultur nicht verändert wurde. Durch die Zugabe von Tunicamycin zum Kulturmedium wurde die CD16-Expression reduziert. Bei der Zugabe der in Protokollen angegebenen Konzentration von 1 μ g/ml Kulturmedium wurde die Expression von CD16 auf Hintergrundwerte reduziert. In weiteren Experimenten mußte die Tunicamycinmenge verringert werden, um Bereiche mit meßbarer Expression und IgG-Bindung zu erreichen. In folgenden Tests wurde die Substanz mit einer Konzentration von 0,5 μ g/ml Kulturmedium eingesetzt.

Nach 30-stündiger Inkubation mit Tunicamycin ging die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche auf etwa 50% des Ausgangswertes zurück. Die Bindungskurven des Referenzantikörpers CLB-Gran1 an CD16-Wildtyp-transfizierte Zellen nach Inkubation mit und ohne Tunicamycin sind in dem Histogramm in Abbildung 13 gezeigt.

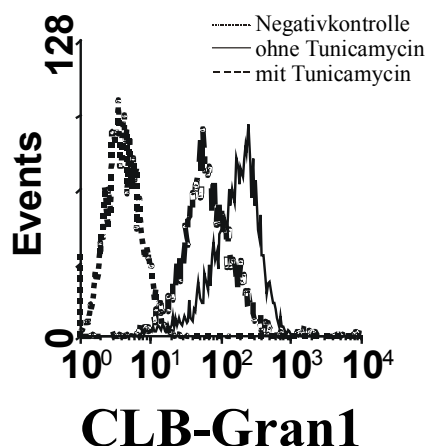


Abbildung 13: Einfluß von Tunicamycin auf die CD16-Expression WT-transfizierter Zellen

Das Histogramm zeigt die Expressionsdichte des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche von WT-CD16-transfizierten Zellen nach der Inkubation ohne und mit Tunicamycin (0,5 μ g/ml) im Vergleich mit der Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den Rezeptor inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht.

Ergebnisse

In einem weiteren Teil des Versuches wurde die Bindung von humanem monomerem IgG an die transfizierten Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des IgG1 vorinkubiert und die gebundene Antikörpermenge durch einen gegen IgG gerichteten Sekundärantikörper (FITC-gekoppelt) sichtbar gemacht. Bei dieser Untersuchung sollten die Effekte der Deglycosylierung der beiden Linien mit WT- und N163Q-CD16 verglichen werden. Die Auswertung der direkten Fluoreszenzintensitäten der Ansätze mit WT-CD16 ergab eine deutlich höhere Bindung von IgG bei den N163Q-CD16-transfizierten Zellen in den Ansätzen ohne Tunicamycin. Nach deglycosylierender Behandlung mit Tunicamycin zeigte sich in diesen Ansätzen eine deutliche Reduktion der IgG-Bindung auf 50-60% der Ausgangswerte. Diese Reduktion war auf die verminderte CD16-Expression zurückzuführen. In den Ansätzen mit WT-CD16 war trotz Reduktion der CD16-Expression kein deutlicher Effekt der Deglycosylierung auf die IgG-Bindung festzustellen. In der Relation der gebundenen IgG-Menge zur Expression von CD16 auf der Zelloberfläche wurde der Effekt der Deglycosylierung deutlich. In Abbildung 14 sind die nach Standardisierung mit CLB-Gran1 erhaltenen Werte gezeigt.

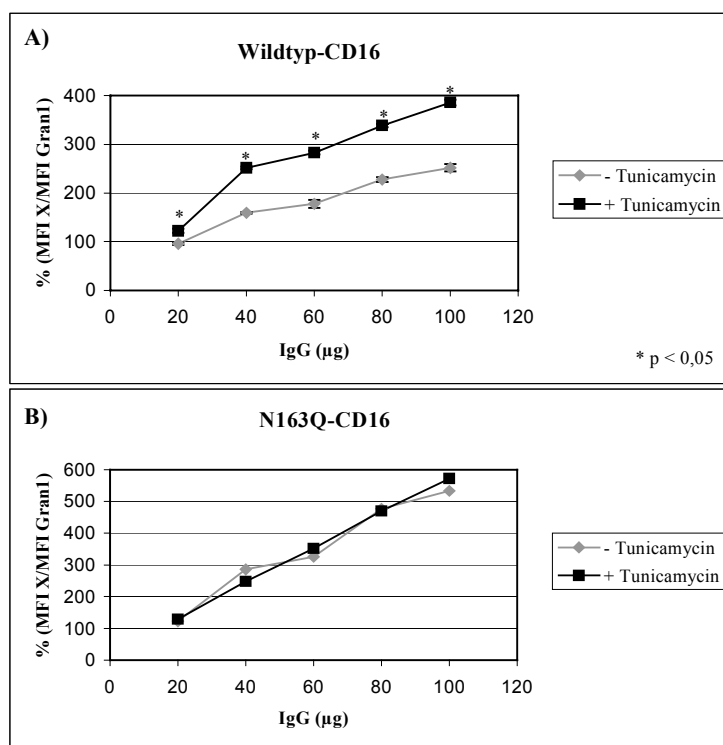


Abbildung 14: Bindung von IgG an CD16-transfizierte Zellen nach Inkubation mit Tunicamycin

Die CD16-transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,5 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des monomeren humanen IgG1 vorinkubiert (0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg). Die gebundene Antikörpermenge wurde durch einen FITC-gekoppelten anti-hIgG in der Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht. Der CD16-Antikörper CLB-Gran1 wurde als Referenz gewählt, um den Vergleich der Messungen zu gewährleisten. Die Abbildung zeigt die IgG nach Inkubation ohne und mit Tunicamycin der Zell-Linien WT-CD16 (A) und N163Q-CD16 (B).

Ergebnisse

In den IgG-Bindungsassays mit den Wildtyp-CD16-transfizierten Zellen zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der IgG-Bindung in den Ansätzen ohne und mit Tunicamycin. Dieser Unterschied entstand durch eine gering veränderte Bindung von IgG bei gleichzeitiger Reduktion der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Durch die Deglycosylierung der Rezeptoren mit Tunicamycin wurde die IgG-Bindung an die einzelnen Rezeptormoleküle erhöht. Dieser Effekt war bei allen Ansätzen mit den WT-transfizierten Zellen sichtbar und signifikant (p-Wert < 0,05).

In den Ansätzen mit N163Q-CD16 wurden sowohl CD16-Expression als auch IgG-Bindung durch Zugabe von Tunicamycin auf Werte von etwa 50% der Kontrollansätze reduziert. Dadurch ergab sich keine Änderung der mit CLB-Gran1 standardisierten Bindungswerte, die IgG-Bindungsrate pro Rezeptor wurde nicht verändert.

Im Vergleich der beiden Zell-Linien WT-CD16 und N163Q-CD16 zeigte sich eine deutlich höhere IgG-Bindung an die mutierten Fc-Rezeptoren in den Ansätzen ohne Tunicamycin. Durch die Zugabe von Tunicamycin zu den transfizierten Zellen stiegen die Bindungswerte der WT-Zellen an. Nach Deglycosylierung dieser Zellen wurden fast die Werte der N163Q-mutierten Zellen erreicht. Die gebundene IgG-Menge der deglycosylierten WT-Rezeptoren betrug zwischen 80 und 90% der N163Q-mutierten Moleküle. In den Kontrollansätzen ohne Tunicamycin wurden nur Werte von 50-55% erreicht.

3.7 Einfluß der Deglycosylierung auf NK-Zellen

Die Ergebnisse der Experimente mit den transfizierten HEK293-Zellen zeigten einen Einfluß der N-Glycosylierung im Bereich der IgG-Bindungsstelle des Fc γ RIIIB auf die Bindung von monomerem IgG. In diesem Versuch dienten NK-Zellen als Rezeptor-tragende Zellen. Mit ihnen sollte nachgewiesen werden, daß die Glycosylierung der Rezeptoren auch bei solchen Zellen eine Rolle bei der Beeinflussung der IgG-Bindung spielt, die physiologischerweise den Fc γ -Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Dazu wurde Tunicamycin als deglycosylierendes Agens eingesetzt. Diese Substanz, die aus verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen gewonnen wird, blockiert die Bildung von N-Glycosylierungen durch Inhibition des Transfers von N-Acetylglucosamin-1-Phosphat auf Dolichol-Monophosphat. Die NK-Zellen der Linie CNK6 wurden 24-48 Stunden vor dem Testansatz aufgetaut und mit IL-2 in Kultur genommen. Nach dieser Vorlaufzeit wurden die Zellen für 30 Stunden mit der deglycosylierenden Substanz Tunicamycin (1 μ g/ml) inkubiert und anschließend die Expression von CD16 und die IgG-Bindung an die Zellen bestimmt.

Die Zell-Linie CNK6 zeigte eine deutliche Expression des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche, die auch nach einer mehrtägigen Kultur mit IL-2 nicht verändert wurde. Durch die Zugabe von Tunicamycin zum Kulturmedium wurde die CD16-Expression reduziert. Nach 30-stündiger Inkubation mit dieser Substanz ging die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche auf etwa 60% des Ausgangswertes zurück. Die Bindungskurven des Referenzantikörpers CLB-Gran1 an NK-Zellen nach Inkubation mit und ohne Tunicamycin sind in dem Histogramm in Abbildung 15 gezeigt.

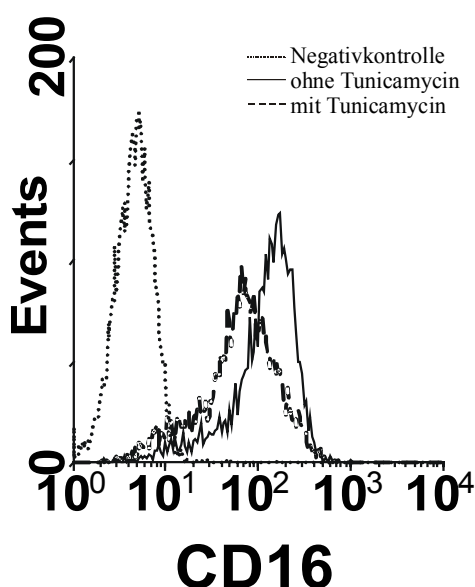


Abbildung 15: Einfluß von Tunicamycin auf die CD16-Expression von NK-Zellen

Das Histogramm zeigt die Expressionsdichte des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche nach der Inkubation ohne und mit Tunicamycin (1 μ g/ml) im Vergleich mit der Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den Rezeptor (CLB-Gran1) inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht.

Ergebnisse

In einem weiteren Teil dieses Experiments wurde die Bindung von humanem monomerem IgG an die NK-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des IgG vorinkubiert und die gebundene Antikörpermenge durch einen gegen IgG gerichteten Sekundärantikörper (FITC-gekoppelt) sichtbar gemacht. In diesem Versuch zeigte sich eine geringe Reduktion der gebundenen IgG-Menge bei stark verminderter CD16-Expression. Erst in der Relation der gebundenen IgG-Menge zur Expression von CD16 auf der Zelloberfläche wurde der Effekt der Deglycosylierung deutlich. In Abbildung 16 sind die nach Standardisierung mit dem Referenzantikörper CLB-Gran1 erhaltenen Werte der IgG-Bindung gezeigt.

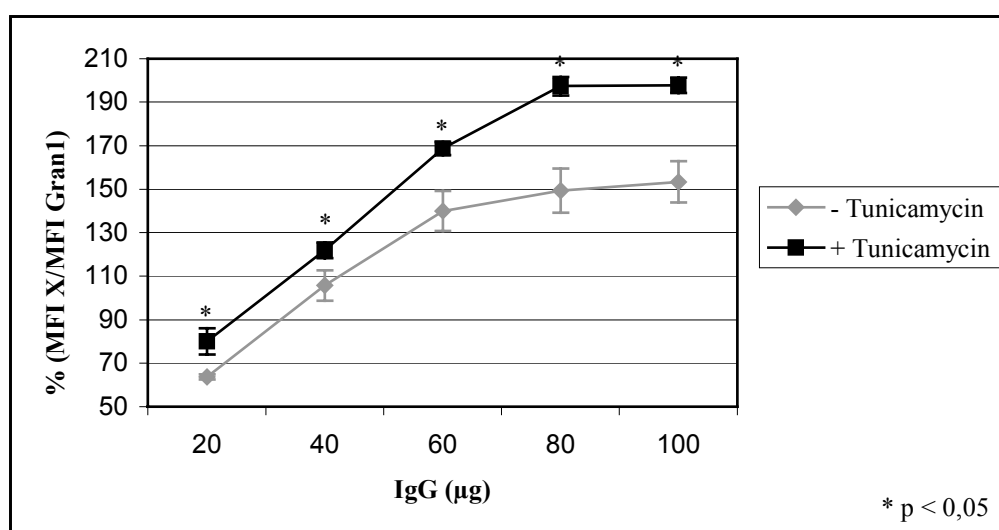


Abbildung 16: Bindung von IgG an humane NK-Zellen nach Inkubation mit Tunicamycin

Die humanen NK-Zellen der Linie CNK6 wurden für 30 Stunden mit 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des monomeren humanen IgG vorinkubiert (0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg). Die gebundene Antikörpermenge wurde durch einen FITC-gekoppelten anti-hIgG in der Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht. Der CD16-Antikörper mit den höchsten gemessenen Fluoreszenzintensitäten (CLB-Gran1) wurde als Referenz gewählt, um den Vergleich der Messungen zu gewährleisten.

In allen IgG-Bindungsassays mit den NK-Zellen war ein deutlicher Unterschied in der IgG-Bindung der Zellen mit Tunicamycin im Vergleich zu den Ansätzen ohne Tunicamycin sichtbar. Dieser Unterschied entstand durch eine kaum veränderte IgG-Bindung an die Zellen bei gleichzeitiger Reduktion der Dichte der Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch die Gabe von Tunicamycin. Dadurch wurde durch die Deglycosylierung der Rezeptoren eine Erhöhung der gebundenen IgG-Menge an die einzelnen Moleküle erreicht. Dieser Effekt war bei allen verwendeten IgG-Konzentrationen (20, 40, 60, 80 und 100 µg) sichtbar und signifikant (p-Wert < 0,05).

3.8 IgG-Bindung an Granulozyten von Patienten mit kryoglobulinämischer Vaskulitis

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob es im Rahmen chronischer entzündlicher Erkrankungen zu einer Veränderung der Glycosylierung der Fc γ -Rezeptoren und damit zu einer Beeinflussung der IgG-Bindung kommt. Dazu wurden Granulozyten aus dem Blut von Patienten mit kryoglobulinämischen Vaskulitiden isoliert und die Bindung von humanem IgG an diese Zellen untersucht. Die Erkrankung Vaskulitis wird durch das Vorhandensein von Gefäßentzündungen charakterisiert. Häufig treten parallel Fieber, Arthritiden und allgemeine Symptome wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Gewichtsverlust auf. Die Ursache der Erkrankung ist die Aktivierung von Fc γ -Rezeptor-tragenden Zellen (Granulozyten, PMN, NK-Zellen und Makrophagen) durch die IgG-haltigen Immunkomplexe. Die Bedeutung der Interaktion der Immunkomplexe mit Fc-Rezeptoren konnte *in vitro* (Hundt *et al.*, 1993) und *in vivo* (Watanabe *et al.*, 1999) gezeigt werden. Als Kontrollzellen wurden Granulozyten von gesunden Blutspendern verwendet. Die isolierten Granulozyten dienten zur vergleichenden Untersuchung der CD16-Expression und der IgG-Bindung an die Zellen. Bei der Bestimmung der Fc γ RIII-Expression war kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen festzustellen. Die Histogramme dieser Messungen sind in Abbildung 17 gezeigt.

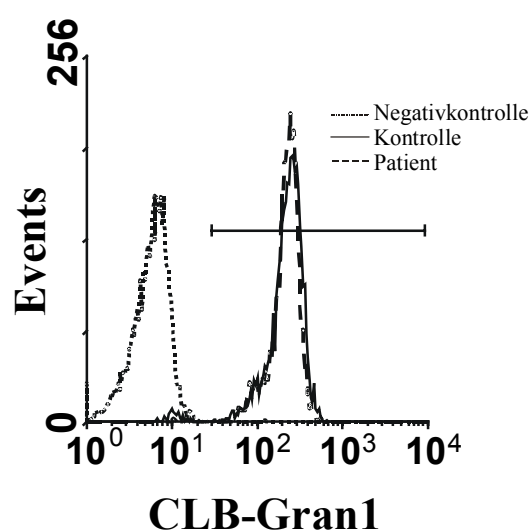


Abbildung 17: CD16-Expression auf Granulozyten

Das Histogramm zeigt die Expressionsdichte des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche von Granulozyten von Patienten mit kryoglobulinämischer Vaskulitis und gesunden Kontrollspendern im Vergleich mit der Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den Rezeptor inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht.

In einem weiteren Teil dieses Experiments wurde die Bindung von humanem monomerem IgG an die Granulozyten untersucht. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des IgG vorinkubiert und die gebundene

Ergebnisse

Antikörpermenge durch einen gegen IgG gerichteten Sekundärantikörper (FITC-gekoppelt) sichtbar gemacht. In diesem Teil des Versuches zeigte sich eine geringere Bindung von IgG an die Zellen der Patienten mit kryoglobulinämischer Vaskulitis. Dieser Effekt trat bei allen gemessenen IgG-Konzentrationen auf (20, 50 und 100 μg). In Abbildung 18 sind die nach Standardisierung mit dem Referenzantikörper CLB-Gran1 erhaltenen Werte der IgG-Bindung gezeigt.

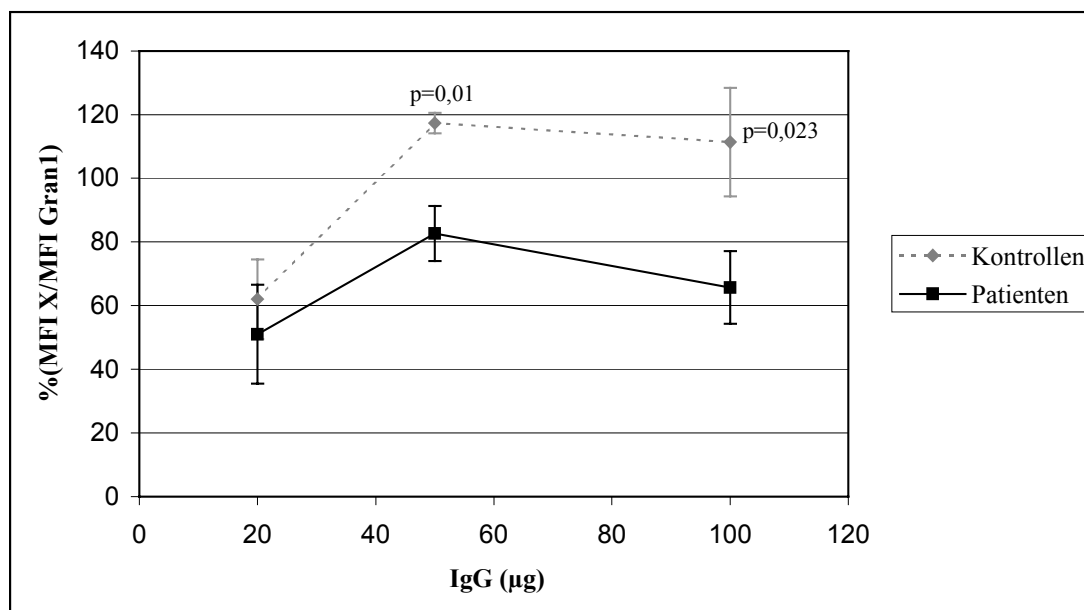


Abbildung 18: Vergleich der IgG-Bindung an Granulozyten von Patienten mit Kryoglobulinämie und gesunden Kontrollspendern

Die Granulozyten der Patienten und Kontrollen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monomeren humanen IgG1 vorinkubiert (0, 20, 50 und 100 μg). Die gebundene Antikörpermenge wurde durch einen FITC-gekoppelten anti-hIgG in der Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht. Der CD16-Antikörper CLB-Gran1 wurde als Referenz gewählt, um den Vergleich der Messungen zu gewährleisten.

3.9 IgG-Bindung an NK-Zellen eines Sarkoidose-Patienten

Im Verlaufe der Studien mit Patienten-Zellen wurden auffällige Bindungskurven mit den Lymphozyten eines Patienten mit Sarkoidose beobachtet. Bei der Sarkoidose handelt es sich um eine granulomatöse Erkrankung mit epitheloidzelligen Granulomen, die meist in der Lunge auftreten. Häufig kommt es außerdem zu einem extrapulmonalem Befall. Betroffen sind hierbei meist die Speicheldrüsen, die Leber oder das Knochenmark. Die Ätiologie der Krankheit ist noch unklar. Am Tage der Blutabnahme stand dieser Patient unter einer Hochdosis-Kortison-Therapie (1mg Prednison/kg Körpergewicht pro Tag). Mit den NK-Zellen dieses Patienten wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt: Bestimmung der

CD16-Expression auf der Zelloberfläche, Zytotoxizitätstests und IgG-Bindungsstudien. Bei der Untersuchung der Fc γ RIII-Expression trat bei dem Patienten im Vergleich mit Kontrollzellen eine gering erhöhte Expressionsdichte auf den NK-Zellen auf (Abbildung 19).

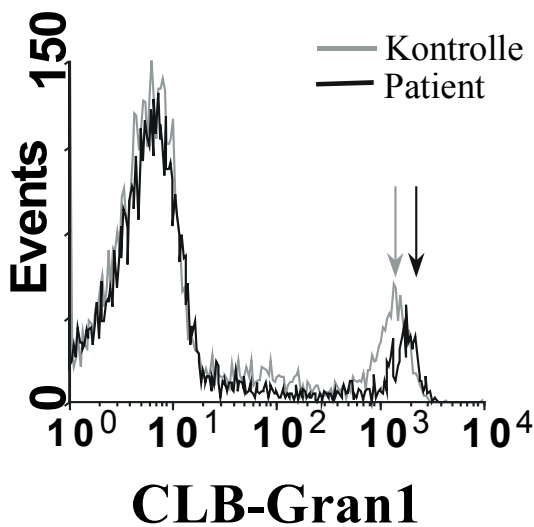


Abbildung 19: CD16-Expression auf Lymphozyten eines Sarkoidose-Patienten

Das Histogramm zeigt die Expressionsdichte des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche von Lymphozyten eines Patienten mit Sarkoidose im Vergleich mit einem gesunden Kontrollspender. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den Rezeptor inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht.

In einem weiteren Teil der Untersuchungen wurde die Bindung von IgG an die Fc γ -Rezeptor-exprimierenden Zellen bestimmt. Dazu wurden Lymphozyten des Patienten und eines gesunden Kontrollspenders mit verschiedenen Konzentrationen des IgG1 vorinkubiert und die gebundene Antikörpermenge durch einen gegen IgG gerichteten Sekundärantikörper (FITC-gekoppelt) sichtbar gemacht. In diesem Experiment war die IgG-Bindung der Zellen des Sarkoidose-Patienten reduziert. In dem Histogramm in Abbildung 20 sind die Bindungskurven von Kontrolle und Patient im Ansatz mit 50 μ g IgG1 gezeigt.

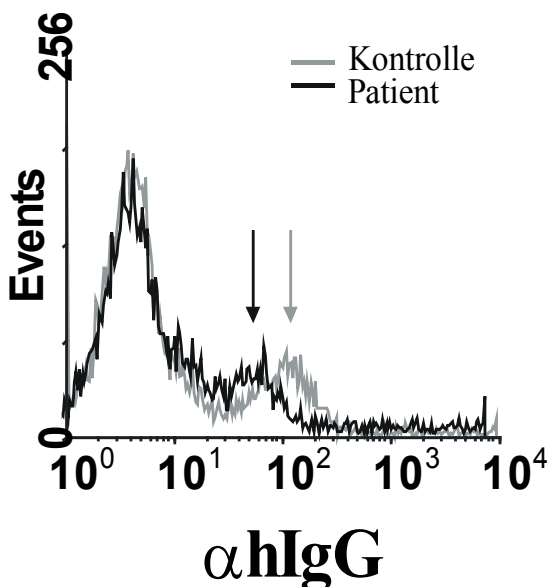


Abbildung 20: IgG-Bindung auf Lymphozyten eines Sarkoidose-Patienten

Das Histogramm zeigt die Bindung von humanem IgG an die Lymphozyten eines Sarkoidose-Patienten im Vergleich mit den Zellen eines gesunden Kontrollspenders. Für die Messungen wurden die Zellen mit 50 μ g humanem IgG1 vorinkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem Fluoreszenz-markierten anti-hIgG in der Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht.

Ergebnisse

Als Funktionstest für die Fc γ -Rezeptoren wurde eine Variante des Zytotoxizitätstests durchgeführt: die Untersuchung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC). Dazu wurden Targetzellen mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr) markiert und mit Antikörpern gegen die Targetzellen beschichtet. Dieser Antikörper ermöglicht die Erkennung der Zellen durch die Fc-Rezeptoren, die Lyse durch die Effektorzellen und damit die Freisetzung des Chroms in den Überstand. Durch die Bestimmung der radioaktiven Zerfälle im Überstand kann die spezifische Lyse durch die NK-Zellen berechnet werden (Abbildung 21).

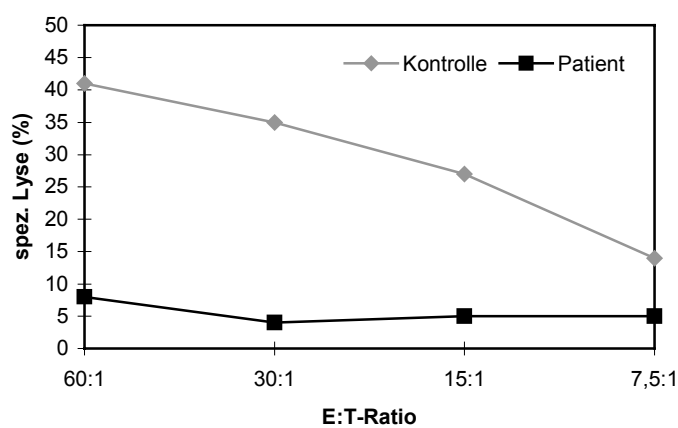


Abbildung 21: Zytotoxizität der Lymphozyten eines Sarkoidose-Patienten

Die Abbildung zeigt die Werte der spezifischen Lyse von L1210-Zellen durch die Patientenzellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Für diesen Test wurden die Target-Zellen L1210 mit ^{51}Cr markiert, mit einem Kaninchen- α L1210-Antikörper beschichtet und in Ansätzen mit verschiedenen Effektor-Target-Relationen (E:T-Ratio; 7,5:1; 15:1; 30:1 und 60:1) mit den NK-Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Menge des freigesetzten radioaktiven Chroms im Überstand bestimmt.

In diesem Test wurde die spezifische Lyse der Patientenzellen ermittelt und mit den Werten eines gesunden Kontrollspenders verglichen. Die Kontrollzellen zeigten im Ansatz mit dem höchsten Effektoren-Target-Verhältnis eine maximale spezifische Lyse von 41%. Dieser Wert sank bei abnehmender Effektorenzahl auf bis zu 15% ab. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen zeigten die Zellen des Sarkoidose-Patienten auch bei hoher Effektorenzahl nur Hintergrundwerte (4-9%). Diese NK-Zellen waren nicht in der Lage, durch die Erkennung der Antikörper-beschichteten Zielzelle über die Fc γ -Rezeptoren die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität auszulösen und die Zielzellen zu lysieren.

3.10 Einfluß von Dexamethason auf NK-Zellen

Im Laufe der Untersuchungen mit den Zellen eines Patienten mit Sarkoidose konnte eine deutliche Reduktion der IgG-Bindung an die NK-Zellen und der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme stand dieser Patient unter einer Hochdosis-Kortison-Therapie (1mg Prednison/kg Körpergewicht pro Tag). Als Ursache der beobachteten Phänomene bei diesem Patienten war ein Effekt der Erkrankung Sarkoidose, aber auch eine Reaktion auf die Kortison-Therapie möglich. Bei den verwendeten Kortison-Präparaten handelte es sich um Glucocorticoide (Steroidhormone der Nebennierenrinde). Die Wirkung dieser Substanzen auf die Zelle wird in genomische und nicht-genomische Effekte unterteilt. Die genomische Wirkung wird über spezifische Rezeptoren der Zielzellen vermittelt. Durch Anlagerung des Corticoids an den Rezeptor kommt es zur Abspaltung von Hitzeschockproteinen und damit zur Aktivierung des Rezeptors. Der aktive Steroid-Rezeptor-Komplex ist in der Lage, an DNA-Promotor-Elemente zu binden und die Transkriptionsrate bestimmter Gene zu beeinflussen. Beispiele für eine Erhöhung der Syntheserate sind Proteine der Annexin-Familie, Endonucleasen und Endopeptidasen. Durch die Bindung an negativ-regulierende DNA-Elemente wird die Synthese einiger Proteine gehemmt. Beispiele für diesen Prozeß sind mehrere Zytokine: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, TNF α . Bei den nicht-genomischen Wirkungen von Corticoiden findet eine Interaktion mit Molekülen der Zellmembran statt. Hierbei tritt eine Änderung der Eigenschaften der Membran auf: Es kommt zu einer erhöhten Stabilität der Membran, die mit einer verminderten Permeabilität für Kationen einhergeht. Diese Veränderungen finden sich im Gegensatz zu den genomischen Effekten auch bei kernlosen Zellen (Erythrozyten).

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluß eines Kortison-Präparates (Dexamethason) auf die IgG-Bindung an die Zellen einer NK-Zell-Linie untersucht werden. Dazu wurden die NK-Zellen der Linie CNK6 24-48 Stunden vor dem Testansatz aufgetaut und in Anwesenheit von IL-2 kultiviert. Nach dieser Vorlaufzeit wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem Kortison-Präparat Dexamethason (4 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD16 und die IgG-Bindung an die Zellen bestimmt. In Abbildung 22 ist die Expression von CD16 nach Inkubation mit und ohne Dexamethason gezeigt.

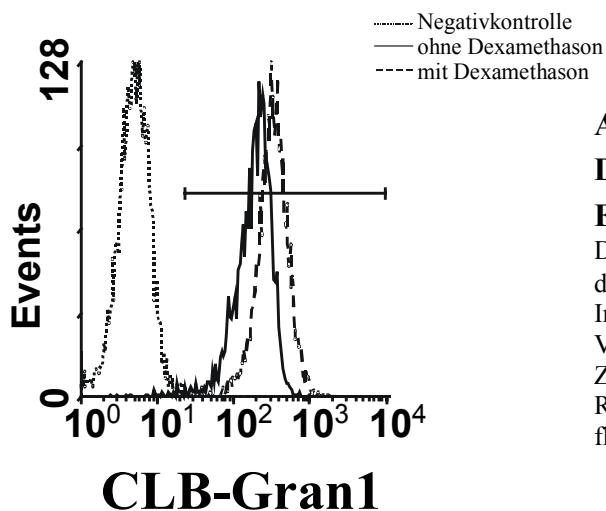


Abbildung 22: Einfluß von Dexamethason auf die CD16-Expression von NK-Zellen

Das Histogramm zeigt die Expressionsdichte des FcγRIII auf der Zelloberfläche nach der Inkubation ohne und mit Dexamethason im Vergleich mit der Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den Rezeptor inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht.

In den Ansätzen mit Dexamethason konnte eine erhöhte Expression von CD16 auf den NK-Zellen festgestellt werden. Diese Zellen zeigten eine größere Dichte der Rezeptoren auf der Zelloberfläche verglichen mit den Zellen der Kontrollansätze. Eine Erhöhung ähnlicher Ausprägung war bei dem Sarkoidose-Patienten unter Coricosteroid-Therapie aufgetreten.

In einem weiteren Teil dieses Experiments wurde die Bindung von humanem monomerem IgG an die NK-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des IgG vorinkubiert und die gebundene Antikörpermenge durch einen gegen IgG gerichteten Sekundärantikörper (FITC-gekoppelt) sichtbar gemacht. In diesem Versuch zeigte sich eine Reduktion der IgG-Bindung nach Inkubation mit Dexamethason. Besonders in der Relation der gebundenen IgG-Menge zur Expression von CD16 auf der Zelloberfläche wurde der Effekt der Dexamethason-Inkubation deutlich. Abbildung 23 zeigt die nach Standardisierung mit dem Referenzantikörper CLB-Gran1 erhaltenen Werte der IgG-Bindung.

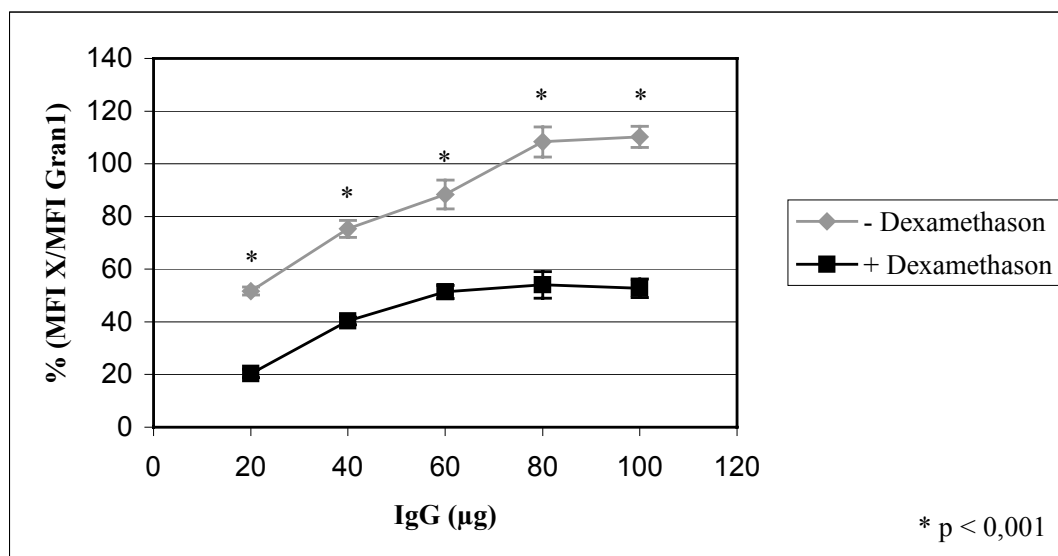


Abbildung 23: Bindung von IgG an humane NK-Zellen nach Inkubation mit Dexamethason

Die humanen NK-Zellen der Linie CNK6 wurden für 24 Stunden mit 4µg/ml Dexamethason inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und mit verschiedenen Konzentrationen des monomeren humanen IgG1 vorinkubiert (0, 20, 40, 60, 80 und 100µg). Die gebundene Antikörpermenge wurde durch einen FITC-gekoppelten anti-hIgG in der Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht. Der CD16-Antikörper mit den höchsten gemessenen Fluoreszenzintensitäten (CLB-Gran1) wurde als Referenz gewählt, um den Vergleich der Messungen zu gewährleisten.

In den Messungen nach Inkubation mit Dexamethason zeigte sich ein deutlicher Effekt der Substanz: Durch die Zugabe von Dexamethason zu NK-Zell-Kulturen wird die Expression von CD16 auf der Zelloberfläche leicht erhöht. Die IgG-Bindung an die Zellen wird dagegen deutlich reduziert. Die mit CLB-Gran1 standardisierten Werte gehen auf etwa 50% der Werte der Kontrollansätze zurück.

Eine direkte Überprüfung der Glycosylierung am Asparagin N163 vor und nach der Inkubation mit Dexamethason ist wegen der Kreuzreaktionen des Antikörpers G7E11 nicht möglich.

4 Diskussion

Die Gruppe der Fc-Rezeptoren ist an der Pathogenese verschiedener immunologischer Erkrankungen beteiligt. Dabei spielt die Bindung von Immunkomplexen an Fc γ RIII eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Neutrophilen, Makrophagen und NK-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Glycosylierung des Fc γ RIII bei der Bindung von IgG untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Glycosylierung des Rezeptors an der Aminosäure Asparagin 163, die sich innerhalb der Bindungsstelle für IgG befindet, die IgG-Bindungs-Affinität des Fc γ RIII zu seinem Liganden IgG reduziert.

4.1 Charakterisierung verschiedener CD16-transfizierter Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die vier Asparagin-(N)-Glycosylierungsstellen (N39, N75, N163 und N170) des NA1-Allels von CD16B (GPI-verankerte Form des Moleküls) einzeln zu Glutamin (Q) mutiert, um ihren Einfluß auf die IgG-Bindung zu untersuchen. Die nach der Mutagenese erhaltenen cDNA-Konstrukte und die Wildtyp-cDNA wurden mit der GPI-Verankerungssequenz verknüpft und stabil in die humane embryonale Nierenzell-Linie HEK293 transfiziert. Bei allen fünf Transfektionen konnte eine CD16-Expression von >95% gemessen werden. Zum Ausschluß schwerwiegender Molekülveränderungen durch die Mutationen wurde ein Epitop-Mapping mit den Zell-Linien durchgeführt. Hier zeigte sich eine gleichmäßige Bindung von 9 der 10 gemessenen Antikörpern. Größere strukturelle Veränderungen der Rezeptor-Konformation durch die Deglycosylierung traten nicht auf. Nur die Bindung des Antikörpers G7E11 war bei der Mutante N163Q auf 60% der Wildtyp-Werte reduziert. Diese Reduktion der Antikörperbindung spricht für ein Epitop, daß die Glycosylierung an dieser Stelle (Asparagin 163) beinhaltet. Durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit HLA Klasse 1 (Uciechowski *et al.*, 1989) ist die Verwendung des Antikörpers G7E11 als Marker der Glycosylierung von Rezeptoren auf humanen Blutzellen nicht möglich. Bei den Messungen der transfizierten Zellen stört diese Kreuzreaktion nicht, da diese Zellen kein HLA Klasse 1 auf der Zelloberfläche exprimieren. In diesen Experimenten war die unterschiedliche Glycosylierung der Rezeptoren für die veränderte Antikörper-Bindung verantwortlich. Die Expression anderer IgG-bindender Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Fc γ RI und Fc γ RII) konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

Als Methode zum Nachweis der Interaktion der Fc γ -Rezeptoren mit IgG wurde die FACS-Analyse mit IgG-spezifischen Antikörpern eingesetzt. In diesen Tests wurde monomeres humanes IgG als Ligand verwendet. Nur mit diesen

Liganden konnten suboptimale Bindungsbedingungen erreicht werden, bei denen auch geringe Affinitätsunterschiede bemerkbar waren. Bei dem Einsatz oligomerer Liganden wurde bereits bei sehr geringen Konzentrationen eine Sättigung der Bindung erreicht, die keine Bestimmung der Affinitätsunterschiede mehr erlaubt. In den IgG-Bindungsassays mit den transfizierten Zellen zeigte sich eine deutlich verstärkte Bindung von IgG an die Zell-Linie mit der mutierten cDNA N163Q. Bei dieser cDNA wurde die Glycosylierungsstelle Asparagin-N163 durch die Mutation zu Glutamin ausgeschaltet. Zwischen den Linien mit den anderen veränderten cDNAs und der CD16-WT-Linie konnte kein Unterschied in der IgG-Bindung festgestellt werden. Zur Bestätigung dieser Daten wurden durch die Zugabe des deglycosylierenden Agens Tunicamycin die Glycosylierung sämtlicher Oberflächenmoleküle inhibiert. In den Ansätzen mit den WT-CD16-transfizierten Zellen kam es zu einer Erhöhung der IgG-Bindung auf das Niveau der N163Q-transfizierten Zellen. In den Ansätzen mit N163Q-CD16 war dagegen keine weitere Steigerung sichtbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Glycosylierung der Aminosäure Asparagin 163 die Affinität des CD16 zu seinem Liganden IgG reguliert.

Die Glycosylierungsstelle Asparagin-163 befindet sich in der zweiten Domäne des CD16-Moleküls. Diese Membran-proximale Domäne wird für die direkte IgG-Bindung verantwortlich gemacht; während der Membran-distalen Domäne stabilisierende und Form-gebende Funktionen zugeschrieben werden (Hulett *et al.*, 1994). In Untersuchungen zur Kartierung der IgG-Bindungsregion des Fc γ RIIB konnte gezeigt werden, daß die beiden Aminosäuren Lysin-162 und Valin-164 der zweiten Domäne eine entscheidende Rolle bei der Bindung von IgG spielen (Tamm *et al.*, 1996). Die potentielle Glycosylierungsstelle Asparagin-163 befindet sich zwischen diesen beiden Aminosäuren. Ihre Lage innerhalb der IgG-Bindungsstelle des Fc γ RIII ist stark konserviert. Sie findet sich bei mehreren Spezies, unter anderem bei Katze, Rind und Schwein. Bei anderen Fc-Rezeptoren ist dagegen keine Glycosylierungsstelle innerhalb der Bindungsregion bekannt. In Kokristallisationsexperimenten des Fc γ RIII mit humanen IgG-Fc-Fragmenten konnte die Bindungsregion des Fc-Rezeptors und die wichtige Rolle der beiden angegebenen Aminosäuren bestätigt werden (Sondermann *et al.*, 2000). Dabei schiebt sich der Zuckerbaum am Asparagin-163 zwischen die beiden interagierenden Moleküle. Eine sterische Beeinflussung der Bindung durch die Ausdehnung der Zuckerseitenkette des Fc γ RIII ist somit möglich, konnte im Kristall allerdings nicht direkt analysiert werden, da für diese Experimente prokaryotische, nicht-glycosylierte Rezeptoren verwendet wurden.

In Untersuchungen des Fc γ RIIA auf NK-Zellen und Monozyten zeigten sich Unterschiede in der IgG-Bindung zwischen den Rezeptoren beider Zellgruppen. Diese Unterschiede waren nicht auf Allel-Polymorphismen oder DNA-Sequenz-Varianzen zurückzuführen, sie traten trotz identischer Proteinketten auf. Ursache der

unterschiedlichen Bindung sind Zelltyp-spezifische Glycosylierungen, die zu unterschiedlichen Gehalten verschiedener Zuckerreste innerhalb der Seitenketten führen (Edberg und Kimberly, 1997). In Affinitätsmessungen mit löslichen Fc γ RIIB-Molekülen aus prokaryotischen und eukaryotischen Zellen wiesen die unglycosylierten Moleküle der prokaryotischen Zellen eine erhöhte Affinität für IgG auf (Galon *et al.*, 1997). Die genannten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen somit den Einfluß der Glycosylierung des Fc γ RIII auf die Bindung von IgG.

4.2 Einfluß von Tunicamycin und Dexamethason auf die Bindung von IgG an NK-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses der Glycosylierung der Fc γ -Rezeptoren auf die IgG-Bindung an Zellen, die physiologischerweise Fc-Rezeptoren exprimieren, wurden humane NK-Zellen verwendet, deren Kulturen mit Tunicamycin verstimmt wurden.

Die Substanz Tunicamycin ist ein hydrophobes Analogon von N-Acetylglucosamin. Sie blockiert die Bildung von N-Glycosylierungen durch Inhibition des ersten Syntheseschrittes: der Übertragung von N-Acetylglucosamin-1-Phosphat auf Dolichol-Monophosphat. Experimente mit Tunicamycin wurden mit den verschiedensten Zellen zu den unterschiedlichsten Fragestellungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Inkubation mit Tunicamycin die Expression verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren reduziert. In anderen Fällen kommt es durch die Deglycosylierung zur Inaktivierung der Rezeptoren. Beispiele für diese Tunicamycin-Effekte sind die Herunterregulation des *insulin-like growth factor 1 receptor* (Dricu *et al.*, 1997) und die Inaktivierung des GM-CSF-Rezeptors (Ding *et al.*, 1995) und mehrerer β -1-Integrine (Veiga *et al.*, 1995) durch Deglycosylierung. Die N-Glycosylierung der Rezeptoren ist für ihre vollständige Synthese, den Transport zur Zelloberfläche und/oder die Aktivität essentiell. Die Mechanismen dieser Effekte sind noch nicht bekannt. Als Möglichkeit der Regulation der Proteinexpression durch Tunicamycin wird eine Beeinflussung durch die Oncogene *c-myc* und *Ha-ras* diskutiert. Die Expression dieser Gene zeigt einen Zusammenhang mit dem Glycosylierungsgrad der Oberflächenproteine (Hiraizumi *et al.*, 1991).

Im Falle des Fc γ -RIII wird die Bindung von IgG an den Rezeptor durch die Glycosylierung innerhalb der Bindungsstelle inhibiert. Im Gegensatz zu den genannten Beispielen kommt es durch die Deglycosylierung zu einer Steigerung der Affinität und damit der Aktivität des Rezeptors. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die sterische Behinderung der IgG-Bindung durch die Ausbildung eines Zuckerbaumes innerhalb der Bindungsregion. Eine weitere Möglichkeit ist die Änderung der Rezeptorkonformation durch die Glycosylierung am Asparagin-163,

Diskussion

die eine Bindung von IgG erschwert. Gegen diese Möglichkeit sprechen die Ergebnisse der Bindungsstudien mehrerer Antikörper, die eine starke Variation in der Proteinstruktur ausschließen.

In weiteren Experimenten wurde der Effekt von Corticosteroiden auf die IgG-Bindung untersucht. Dazu wurden humane NK-Zellen mit Dexamethason inkubiert und CD16-Expression und IgG-Bindung bestimmt. In den Ansätzen mit Dexamethason kam es zu einer Steigerung der Expression von CD16 auf der Zelloberfläche, während die Bindung von IgG an die Zellen leicht reduziert wurde. Besonders in der Relation der IgG-Bindung zur CD16-Expression zeigte sich der Effekt der Inkubation mit Dexamethason: Es kam zu einer deutlichen Reduktion der gebundenen IgG-Menge an die einzelnen Rezeptoren.

Die Wirkung der Corticosteroide auf die Zelle wird in genomische und nicht-genomische Effekte unterteilt. Die genomische Wirkung wird über spezifische Rezeptoren der Zielzellen vermittelt. Dabei kommt es durch die Anlagerung des Corticoid-Rezeptorkomplexes an DNA-Promotor-Elemente zu Veränderungen der Transkriptionsraten bestimmter Gene. Bei den nicht-genomischen Wirkungen von Corticoiden findet eine Interaktion mit Molekülen der Zellmembran statt, die zu einer Änderung der Membran-Eigenschaften führt.

Es konnte gezeigt werden, daß im Falle mehrerer Akut-Phase-Proteine sowohl Expression als auch Glycosylierungsmuster durch die Gabe von Dexamethason verändert werden. Beispiele für diese Reaktionen sind die Proteine α -1-Protease-Inhibitor und α -1-Antichymotrypsin (Mackiewicz *et al.*, 1993).

Die Glycosylierung von Proteinen bzw. der Grad der Glycosylierung an den einzelnen Aminosäuren ist von der Aktivität der katalysierenden Enzyme abhängig. Der Aufbau von N-Glycosylierungen an Asparaginresten wird durch spezifische Glycosyl-Transferasen gesteuert. Sie sind für die Übertragung der Zuckerreste an den wachsenden Zuckerbaum verantwortlich.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Dexamethason zeigen einen direkten Einfluß der Substanz auf die Affinität des Fc γ RIII: Es kommt zu einer reduzierten IgG-Bindung nach Dexamethason-Behandlung. Ähnliche Effekte konnten mit den Zellen eines Sarkoidose-Patienten unter Hochdosis-Kortison-Therapie beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dieser Effekte ist das Vorhandensein eines *glucocorticoid response element* innerhalb der Promotorregionen der Glycosyl-Transferase-Gene. Die Bindung des Komplexes aus Corticoid und dem spezifischen Rezeptor an dieses Element könnte zu einer Steigerung der Transkriptionsrate der spezifischen Transferasen führen. Durch diese vermehrte Proteinsynthese käme es zu einer gesteigerten Glycosylierungsrate der Fc γ RIII und damit zu einer Reduktion der Affinität gegenüber IgG.

Die Untersuchungen zeigen eine neue Variante der immunsuppressiven Wirkung der Glucocorticoide: Zusätzlich zu den genannten Wirkungsmechanismen kommt es zu einer Inhibition des Immunsystems durch eine Reduktion der Affinität des Fc γ RIII durch eine erhöhte Glycosylierung des Rezeptors innerhalb seiner IgG-Bindungsstelle.

4.3 Physiologische Bedeutung der Glycosylierung des Fc γ RIII

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der Fc γ -Rezeptor-Glycosylierung bei der Bindung von IgG wurden IgG-Bindungsassays mit Granulozyten von Patienten mit kryoglobulinämischer Vaskulitis durchgeführt. Die Ursache dieser Erkrankung ist die Aktivierung der Fc γ -R-tragenden Zellen durch persistierende, IgG-haltige Immunkomplexe. Die Untersuchung der Patientenzellen ergab eine reduzierte Bindung von IgG bei unveränderter CD16-Expression im Vergleich mit den Kontrollzellen. Eine mögliche Erklärung für diese reduzierte IgG-Bindung bei den Patienten ist eine Herunterregulation der Rezeptor-Affinität. Da sich die eigentliche Aminosäurekette nicht verändert, muß es sich um eine posttranslationale Modifikation des Proteins handeln. Denkbar ist eine Veränderung des Glycosylierungsmusters, die zu einer reduzierten Bindungsaffinität führt.

Eine direkte Überprüfung des Rezeptor-Glycosylierungsgrades war wegen der Kreuzreaktion des Antikörpers G7E11 mit HLA-Klasse 1 nicht möglich (Uciechowski *et al.*, 1989).

Für Hepatozyten konnte gezeigt werden, daß sie auf inflammatorische Stimuli mit einer Veränderung der Synthese und N-Glycosylierung der Akut-Phase-Proteine reagieren. Es wurde ein Einfluß der Zytokine IL-1, IL-6, TGF- β und TNF α auf die N-Glycosylierung festgestellt. Dabei traten sowohl Steigerungen (Typ I) als auch Verminderungen (Typ II) des Verzweigungsgrades der N-Glycane auf (Mackiewicz *et al.*, 1993; van Dijk *et al.*, 1995). *In vivo* verändern sich die verschiedenen Akut-Phase-Proteine während der akuten oder chronischen Entzündung. Die verschiedenen pathophysiologischen Glycoformen der Proteine sind auf Veränderungen während der Biosynthese zurückzuführen.

Im Laufe der Untersuchungen der Patientenzellen wurde bei einem Patienten mit Sarkoidose eine deutlich reduzierte IgG-Bindung und ein Ausfall der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität festgestellt. Die untersuchten Zellen zeigten eine erhöhte CD16-Expression. Als Ursache der Beobachtungen war ein direkter Effekt der Erkrankung, aber auch eine Reaktion auf die Hochdosis-Kortison-Therapie möglich. Durch die Experimente mit NK-Zellen und Dexamethason, die einen Einfluß der Substanz auf die IgG-Bindung zeigen, war ein Effekt durch die Gabe von Kortison wahrscheinlich.

Diskussion

Die wahrscheinlichste Ursache der Affinitätsreduktion ist hierbei die Erhöhung des Glycosylierungsgrades im Bereich der IgG-Bindungsstelle.

Für andere Rezeptoren konnte eine Affinitätsänderung durch Glycosylierung gezeigt werden: Die Glycosylierung bestimmter Glycosylierungsstellen des *gastrin-releasing peptide receptor* beeinflusst den Transport des Proteins zur Zelloberfläche, die Kopplung an G-Proteine und Liganden-Bindung (Benya *et al.*, 2000). Im Falle des GM-CSF-Rezeptors ist die N-Glycosylierung extrazellulärer Bereiche der β -Untereinheit essentiell für die Bindung von GM-CSF (Niu *et al.*, 2000). In Maus-Melanom-Zellen konnte eine Abhängigkeit der biologischen Aktivität der b-1-Integrine vom Grad der Glycosylierung festgestellt werden (Veiga *et al.*, 1995). Ein funktioneller Einfluß der Glycosylierung auf die Aktivität eines Rezeptors wurde beim CD43 beschrieben. Die Bindung eines spezifischen Antikörpers für die Aktivitäts-assoziierte Form des Rezeptors ist abhängig vom Grad der Glycosylierung des Rezeptors: Eine hohe Antikörperbindung und damit eine hohe Aktivität des Rezeptors wurde bei Abwesenheit der beiden Glycosylierungsstellen beobachtet (Carlow *et al.*, 1999).

Hier konnte erstmals die direkte Inhibition der Bindung eines Liganden an den Rezeptor durch eine Glycosylierung im Bindungszentrum belegt werden. Dies spricht für eine Funktion der Glycosylierung als Regulationsmechanismus der Bindungsaffinität.

Die Veränderung der Affinität des Rezeptors gegenüber dem Liganden IgG ist ein möglicher Ansatzpunkt zur Therapie Fc γ -R-vermittelter Erkrankungen. Bei Fc-Rezeptor-vermittelten Erkrankungen kommt es durch Bindung verschiedener Antikörper zur Aktivierung der Effektorzellen und zur Ausbildung des Krankheitsbildes. Beispiele hierfür sind die IgG-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion (Typ II) durch die Interaktion der Antikörper gegen zelluläre Antigene mit Fc-Rezeptoren und/oder Komplement, die zur Lyse von Thrombozyten bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP; Witte *et al.*, 1993) oder zur Erythrozytolyse bei der autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA; Snyder *et al.*, 1995) führt. Bei diesen Erkrankungen könnte eine Therapie mit glycosylierenden Substanzen die Affinität der Fc-Rezeptoren gegenüber den Antikörpern reduzieren und die Lyse der Thrombozyten/Erythrozyten vermindern. Für andere Proteine konnte ein Einfluß von Zytokinen auf den Glycosylierungsgrad gezeigt werden (Mackiewicz *et al.*, 1993; van Dijk *et al.*, 1995). Ein Einsatz inflammatorischer Zytokine zur Erhöhung der N-Glycosylierungsrate und damit zur Senkung der Affinität des Rezeptors ist denkbar.

5. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AIHA	autoimmun-hämolytische Anämie
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CH	Konstante Domäne der schweren Kette des Immunglobulins
CL	Konstante Domäne der leichten Kette des Immunglobulins
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
d	Tag
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleosintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
Fc-R	Fc-Rezeptor
Fc γ -R	Fc-Rezeptor für IgG
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtslichtstreuung
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
hIgG	humanes IgG
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>intracellular tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>intracellular tyrosine-based inhibition motif</i>
ITP	idiopathische thrombozytopenische Purpura

Abkürzungsverzeichnis

K _a	Affinitätskonstante
kb	Kilobase
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
OD	optische Dichte
NA	<i>neutrophil antigen system</i>
NK	<i>natural killer</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMN	polymorph-nucleäre Zellen
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SSC	Seitwärtslichtstreuung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>Unit</i> /Einheit
UV	Ultraviolett
VH	variable Domäne der schweren Kette des Immunglobulins
VL	variable Domäne der leichten Kette des Immunglobulins
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Volumen/gewicht
w/w	Gewicht/Gewicht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactopyranosid

6. Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994). Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc., New York, London

Allan, J.M., Seed, B. (1989). Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* 1989, **243**: 378-381

Astier, A., de-la-Salle, H., de-la-Salle, C., Bieber, T., Esposito-Farese, M.E., Freund, M., Cazenave, J.P., Fridman, W.H., Tiellaud, J.L., Hanau, D. (1994). Human epidermal Langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc γ RII/CD32) that inhibits the binding of immune complexes to Fc γ R⁺ cells. *J Immunol* 1994; **152**: 201-212

Bazil, V., Strominger, J.L. (1994). Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44 and CD16 from stimulated human granulocytes. *J Immunol* 1994; **152**: 1314-1322

Benya, R.V., Kusui, T., Katsuno, T., Tsuda, T., Mantey, S.A., Battey, J.F., Jensen, R.T. (2000). Glycosylation of the gastrin-releasing peptide receptor and its effect on expression, G protein coupling, and receptor modulatory processes. *Mol Pharmacol* 2000; **58**: 1490-1501

Bramwell, M., Davies, A., Balswin, S. (1990). Heterogeneity of the glucose transporter in malignant and suppressed hybrid cells. *Exp Cell Res* 1990; **188**: 97-104

Brekke, O.H., Michaelsen, T.E., Sandin, R., Sandlie, I. (1993). Activation of complement by an IgG molecule without a genetic hinge. *Nature* (1993); **363**: 628-630

Brooks, D.J., Qiu, W.Q., Luster, A.D., Ravetch, J.V. (1989). Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). *J Exp Med* 1989; **170**: 1369-1385

Calle, Y., Palomares, T., Castro, B., del Olmo, M., Bilbao, P., Alonso-Varona, A. (2000). Tunicamycin treatment reduces intracellular glutathione levels: Effect on the metastatic potential of the rhabdomyosarcoma cell line S4MH. *Chemotherapy* 2000; **46**: 408-428

Cambier, J.C. (1995). Antigen and Fc receptor signalling. The awesome power of the immuno receptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 1995; **155**: 3281-3285

Carlow, D.A., Ardman, B., Ziltener, J. (1999). A novel CD8 T cell-restricted CD45RB epitope shared by CD43 is differentially affected by glycosylation. *J Immunol.* 1999; **163**: 1441-1448

Cerboni, C., Gismondi, A., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. (1998). CD16-mediated activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) in human NK cells involves tyrosine phosphorylation of Cbl and its association with Grb2, Shc, pp36 and p85 PI-3K subunit. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 1005-1015

Chammas, R., Veiga, S., Travassos, L., Brentani, R. (1993). Functionally distinct roles for glycosylation of alpha and beta integrin chains in cell-matrix interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1795-1799

Chappel, M.S., Isenman, D.E., Everett, M., Xu, Y.Y., Dorrington, K.J., Klein, M.H. (1991). Identification of the Fc gamma receptor class I binding site in human IgG through the use of recombinant IgG1/IgG2 hybrid and point-mutated antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9036-9040

Chuang, F.Y.S., Sassaroli, M., Unkeless, J.C. (2000). Convergence of Fcγ receptor IIA and Fcγ receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol* 2000; **164**: 350-360

Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffith, A.D., Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991; **352**: 624-628

Clynes, R., Ravetch, J.V. (1995). Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity* 1995; **3**: 21-26

Clynes, R., Dumitru, C., Ravetch, J.V. (1998). Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 1998; **279**: 1052-1054

Dangl, J.L., Wensel, T.G., Morrison, S.L., Stryer, L., Herzenberg, L.A., Ol, V.T. (1988). Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J* 1988; **7**: 1989-1994

de Andres, B., Mueller, A.L., Verbeek, S., Sandor, M., Lynch, R.G. (1998). A regulatory role for Fc gamma receptors CD16 and CD32 in the development of murine B cells. *Blood* 1998; **92**: 2823-2829

de Haas, M., Kleijer, M., Minchinton, R.M., Roos, D., von dem Borne, A.E. (1994). Soluble Fc gamma RIIIa is present in plasma and is derived from natural killer cells. *J Immunol* 1994; **152**: 900-907

de Haas, M., Koene, H.R., Kleijer, M., de Vries, E., Simsek, S., van Tol, M.J., Roos, D., von dem Borne, A.E. (1996). A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIa. *J Immunol* 1996; **156**: 3948-3955

de la Salle, H., Galon, J., Bausinger, H., Spehner, D., Bohbot, A., Cohen, J., Cazenave, J.P., Friman, W-H., Sautès, C., Hanau, D. (1997). Soluble CD16/Fc gamma RIII induces maturation of dendritic cells and production of several cytokines including IL-12. *Adv Exp Med Biol* 1997; **417**: 345-352

Deo, Y.M., Graziano, R.F., Repp, R, van de Winkel, J.G.J. (1997). Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc γ R-directed immunotherapies. *Immunology today* 1997; **18**: 127-129

Ding, D., Vera, J., Heaney, M., Golde, D. (1995). N-glycosylation of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit is essential for ligand binding and signal transduction. *J Biol Chem* 1995; **270**: 24580-24584

Dricu, A., Carlberg, M., Wang, M., Larsson, O. (1997). Inhibition of N-linked glycosylation using tunicamycin causes cell death in malignant cells: Role of down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor in induction of apoptosis. *Cancer Res* 1997; **57**: 543-548

Duncan, A.R., Woof, J.M., Partridge, L.J., Burton, D.R., Winter, G. (1988). Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature* 1988; **332**: 563-564

Durum, S.K., Lee, C.K., Geiman, T.M., Murphy, W.J., Muegge, K. (1998). CD16 cross-linking blocks rearrangement of the TCRbeta locus and development of alphabeta T cells and induces development of NK cells from thymic progenitors. *J Immunol* 1998; **161**: 3325-3329

Edberg, J.C., Kimberly, R.P. (1997). Cell type-specific glycoforms of Fc gamma RIIIa (CD16): differential ligand binding. *J Immunol* 1997; **159**: 3849-3857

Engelhardt, W., Matzke, J., Schmidt, R.E. (1995). Activation-dependent expression of low affinity IgG receptors Fc gamma RII (CD32) and Fc gamma RIII (CD16) in subpopulations of human T lymphocytes. *Immunobiology* 1995; **192**: 297-320

Ericson, S.G., Coleman, K.D., Wardwell, K., Baker, S., Fanger, M.W., Guyre, P.M., Ely, P. (1996). Monoclonal antibody 197 (anti-Fc gamma RI) infusion in a patient with immune thrombocytopenia purpura (ITP) results in down-modulation of Fc gamma RI on circulating monocytes. *Br J Haematology* 1996; **92**: 718-724

Ernst, L.K., van de Winkel, J.G., Chiu, I.M., Anderson, C.L. (1992). Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* 1992; **267**: 15692-15700

Ernst, L.K., Duchemin, A.M., Anderson, C.L. (1993). Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI) with the gamma subunit of the IgE receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6023-6027

Furuke, K., Burd, P.R., Horvath-Arcidiacono, J.A., Hori, K., Mostowski, H., Bloom, E.T. (1999). Human NK cells express endothelial nitric oxide synthase, and nitric oxide protects them from activation-induced cell death by regulating expression of TNF-alpha. *J Immunol* 1999; **163**: 1473-1480

Galea-Lauri, J., Darling, D., Gan, S.U., Krivochtchapov, L., Kuiper, M., Gaken, J., Souberbielle, B., Farzaneh, F. (1999). Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J Immunol* 1999; **163**: 62-70

Galon, J., Robertson, M.W., Galinha, A., Mazières, N., Spagnoli, R., Fridman, W-H., Sautès, C. (1997). Affinity of the interaction between Fc gamma receptor type III (FcγRIII) and monomeric human IgG subclasses. Role of FcγRIII glycosylation. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1928-1932

Galon, J., Moldovan, I., Provost-Marloie, M.A., Kaudewitz, H., Roman-Roman, S., Fridman, W-H., Sautès, C. (1998). Identification of the cleavage site involved in production of plasma soluble Fc gamma receptor type III (CD16). *Eur J Immunol* 1998; **28**: 2101-2107

- Gessner, J.E., Grussenmeyer, T., Dumbsky, M., Schmidt, R.E. (1996).** Separate promoters from proximal and medial control regions contribute to the natural killer cell-specific transcription of the human Fc γ RIII-A (CD16-A) receptor gene. *J Biol Chem* 1996; **271**: 30755-30764
- Gessner, J.E., Heiken, H., Tamm, A., Schmidt, R.E. (1998).** The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* 1998; **76**: 231-248
- Goldsmith, E.B., Erickson, B.W., Thompson, N.L. (1997).** Synthetic peptides from mouse Fc receptor (MoFc γ RII) that alter the binding of IgG to MoFc γ RII. *Biochemistry* 1997; **36**: 952-959
- Hasegawa, M., Hidaka, Y., Wada, A., Hirayama, T., Shimonishi, Y. (1999).** The relevance of N-glycosylation to the binding of a ligand to guanylat cyclase C. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 338-346
- Hazenboz, W.L.W., Gessner, J.E., Hofhuis, F.M.A., Kuipers, H., Meier, D., Heijnen, I.A.F.M., Schmidt, R.E., Sandor, M., Capel, P.J.A., Daëron, M., van de Winkel, J.G.J., Verbeek, J.S. (1996).** Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc γ RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 1996; **5**: 181-188
- Heller, T., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Klos, A., Bautsch, W., Köhl, J. (1999).** Cutting edge: Fc receptor type I for IgG on macrophages and complement mediate the inflammatory response in immune complex peritonitis. *J Immunol* 1999; **162**: 5657-5661
- Hendrich, C., Kuipers, J.G., Kolanus, W., Hammer, M., Schmidt, R.E. (1991).** Activation of CD16⁺ effector cells by rheumatoid factor complex. *Arthritis Rheum* 1991; **34**: 423-432
- Hibbs, M.L., Bonadonna, L., Scott, B.M., McKenzie, I.F.C., Hogarth, P.M. (1988).** Molecular cloning of a human immunoglobulin G receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2240-2244
- Hibbs, M.L., Tolvanen, M., Carpén, O. (1994).** Membran-proximal Ig-like domain of Fc γ RIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. *J Immunol* 1994; **152**: 4466-4474

Ho, H.H., Gilbert, M.T., Nussenzweig, D.R., Gershengorn, M.C. (1999). Glycosylation is important for binding to human calcitonin receptors. *Biochemistry* 1999; **38**: 1866-1872

Hoogenboom, H.R., Griffith, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res*; **19**: 4133-4137

Huizinga, T.W., Kleijer, M., Tetteroo, P.A., Roos, D., von dem Borne, A.E. (1990). Biallelic neutrophil NA-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). *Blood* 1990; **75**: 213-217

Hulett, M.D., Hogarth, P.M. (1994). Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 1994; **57**: 1-127

Hundt, M., Zielinska-Skowronek, M., Schmidt, R.E. (1993). Fc gamma receptor activation of neutrophils in cryoglobulin-induced leukocytoclastic vasculitis. *Arthritis Rheum* 1993; **36**: 974-982

Ierino, F.L., Powell, M.S., McKenzie, I.F.C., Hogarth, P.M. (1993). Recombinant soluble human Fc γ RII: Production, characterization and inhibition of the Arthus reaction. *J Exp Med* 1993; **178**: 1617-1628

Ierino, F.L., Hulett, M.D., McKenzie, I.F., Hogarth, P.M. (1993a). Mapping epitopes of human Fc gamma RII (CDw32) with monoclonal antibodies and recombinant receptors. *J Immunol* 1993; **150**: 1794-1803

Janeway, C.A., Travers, P (1995). *Immunologie*; Spektrum akademischer Verlag GmbH; Heidelberg

Jefferis, R., Lund, J., Pound, J. (1990). Molecular definition of interaction sites on human IgG for Fc receptors (huFc gamma R). *Mol Immunol* 1990; **27**: 1237-1240

Kaiser, H., Kley, H.K. (1997). *Cortisontherapie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- Kim, J.K., Tsen, M.F., Ghetie, V., Ward, E.S. (1994).** Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 542-548
- Kramer, R., Weber, T., Arceci, R., Ramchurren, N., Kastrinakis, W., Steele, G.Jr., Summerhayes, I. (1995).** Inhibition of N-linked glycosylation of P-glycoprotein by tunicamycin results in a reduced multidrug resistance. *Br J Cancer* 1995; **71**: 670-675
- Krauss, J.C., Poo, H., Xue, W., Mayo-Bond, L., Todd, R.F., Petty, H.R. (1994).** Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc γ receptor IIIB and the complement receptor Type 3. *J Immunol* 1994; **153**: 1769-1777
- Kuan, S., Byrd, J., Basbaum, C., Kim, Y. (1989).** Inhibition of mucin glycosylation by aryl-N-acetyl- α -galactosaminides in human colon cancer. *J Biol Chem* 1989; **264**: 19271-19277
- Kurosaki, T., Gander, I., Wirthmueller, U., Ravetch, J.V. (1992).** The beta subunit of the Fc epsilon RI is associated with the Fc gamma RIII on mast cells. *J Exp Med* 1992; **175**: 447-451
- Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J., Phillips, J.H. (1988).** Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol* 1988; **141**: 3478-3485
- Letourneur, O., Kennedy, I.C., Brini, A.T., Ortaldo, J.R., O'Shea, J.J., Kinet, J.P. (1991).** Characterization of the family of dimers associated with Fc receptors (Fc epsilon RI and Fc gamma RIII). *J Immunol* 1991; **147**: 2652-2656
- Mackiewicz, A., Laciak, M., Gorny, A., Baumann, H. (1993).** Leukemia inhibitory factor, interferon gamma and dexamethasone regulate N-glycosylation of alpha 1-protease inhibitor in human hepatoma cells. *Eur J Cell Biol* 1993; **60**: 331-336
- Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D.M., Jo, C.H., Boyson, J.E. (1999).** Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5640-5644
- Mathiot, C., Galon, J., Tartour, E., Teillaud, J.L., Facon, T., Bataille, R., Fridman, W.H., Sautès, C. (1999).** Soluble CD16 in plasma dyscrasias. *Leuk Lymphoma* 1999; **32**: 467-474

Niu, L., Heaney, M.L., Vera, J.C., Golde, D.W. (2000). High-affinity binding to the GM-CSF receptor requires intact N-glycosylation sites in the extracellular domain of the beta subunit. *Blood* 2000; **95**: 3357-3362

Park, J.G., Murray, R.K., Chien, P., Darby, C., Schreiber, A.D. (1993). Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by Fc gamma RIIIA. *J Clin Invest* 1993; **92**: 2073-2079

Peltz, G.A., Grundy, H.O., Lebo, R.V., Yssel, H., Barsh, G.S., Moore, K.W. (1989). Human FcγRIII: Cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1013-1017

Poo, H., Krauss, J.C., Mayo-Bond, L., Todd, R.F., Petty, H.R. (1995). Interaction of Fcγ receptor IIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants: evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies. *J Mol Biol* 1995; **247**: 597-603

Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Sun, P.D. (2001). The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem* 2001; **276**: 16469-16477

Rappaport, E.F., Cassel, D.L., Walterhouse, D.O., McKenzie, S.E., Surrey, S., Keller, M.A., Schreiber, A.D., Schwartz, E. (1993). A soluble form of the human receptor FcγRIIa: cloning, transcript analysis and detection. *Exp Hematol* 1993; **21**: 689-696

Ravetch, J.V. & Perussia, B. (1989). Alternative membrane forms of Fc gamma RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989; **170**: 481-497

Ravetch, J.V., Lanier, L.L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* 2000; **290**: 84-89

Schmidt, R.E., Budde, U., Schafer, G., Stroehmann, I. (1981). High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1981 (letter); **2**: 475-476

Silverton, E.W., Navia, M.A., Davies, D.R. (1977). Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 5140-5144

Sondermann, P., Huber, R., Jacob, U. (1999). Crystal structure of the soluble form of the human Fc γ -receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO* 1999; **18**: 1095-1103

Sondermann, P., Jacob, U., Kutscher, C., Frey, J. (1999). Characterization and crystallization of soluble human Fc γ receptor II (CD32) isoforms produced in insect cells. *Biochemistry* 1999; **38**: 8469-8477

Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., Jacob, U. (2000). The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ RIII complex. *Nature* 2000; **406**: 267-273

Standley, S., Baudry, M. (2000). The role of glycosylation in ionotropic glutamate receptor ligand binding, function, and trafficking. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 1508-1516

Sylvestre, D.L., Ravetch, J.V. (1994). Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* 1994; **265**: 1095-1098

Sylvestre, D.L., Ravetch, J.V. (1996). A dominant role for mast cell Fc receptors in the Arthus reaction. *Immunity* 1996; **5**: 387-390

Takai, T., Li, M., Sylvestre, D.L., Clynes, R., Ravetch, J.V. (1994). FcR γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 1994; **76**: 519-529

Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H., Ravetch, J.V. (1996). Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mouse. *Nature* 1996; **379**: 346-349

Tamm, A., Kister, A., Nolte, K.U., Gessner, J.E., Schmidt, R.E. (1996). The IgG binding site of human Fc γ RIIIB receptor involves CC' and FG loops of the membrane proximal domain. *J Biol Chem* 1996; **271**: 1-8

Tamm, A., Schmidt, R.E. (1997). IgG binding sites on human Fc γ receptors. *Intern Rev Immunol*; **16**: 57-85

Thomas, M.L (1995). Of ITAMs and ITIMs: Turning in and of the B cell antigen receptor. *J Exp Med* 1995; **181**: 1653-1656

- Tkacz, J.S., Lampen, O. (1975).** Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; **65**: 248-257
- Uciechowski, P., Schubert, J., Wordelmann, K., Schmidt, R.E. (1989).** Phenotypic and functional studies using CD16 antibodies on human NK-clones. *Leucocyte typing IV*, Oxford University Press 1989
- Ujike, A., Ishikawa, Y., Ono, M., Yuasa, T., Yoshino, T., Fukumoto, M., Ravetch, J.V., Takai, T. (1999).** Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *J Exp Med* 1999; **189**: 1573-1579
- Unkeless, J.C., Scigliano, E., Fridman, V.H. (1988).** Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann Rev Immunol* 1988; **6**: 251-281
- van den Herik-Oudijk, I.E., Westerdaal, N.A., Henriquez, N.V., Capel, P.J., van de Winkel, J.G. (1994).** Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. *J Immunol* 1994; **152**: 574-585
- van de Winkel, J.G.J., Capel, P.J.A. (1993).** Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 1993; **14**: 215-221
- van Dijk, W., Mackiewicz, A. (1995).** Interleukin-6-type cytoline-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **762**: 319-330
- Veiga, S.S., Chammas, R., Cella, N., Brentani, R.R. (1995).** Glycosylation of beta-1 integrins in B16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. *Int J Cancer* 1995; **61**: 420-424
- Vely, F., Gruel, N., Moncuit, J., Cochet, O., Rouard, H., Dare, S., Galon, J., Sautès, C., Fridman, W-H., Teillaud, J.L. (1997).** A new set of monoclonal antibodies against human Fc gamma RII (CD32) and Fc gamma RIII (CD16): characterization and use in various assays. *Hybridoma* 1997; **16**: 519-528
- Warmerdam, P.A., van de Winkel, J.G., Vlug, A., Westerdaal, N.A., Capel, P.J. (1991).** A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* 1991; **147**: 1338-1343

Warmerdam, P.A., Nabben, N.M.J.M., van de Graaf, S.A.R., van de Winkel, J.G., Capel, P.J.A. (1992). The human low affinity IgG receptor IIC is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem* 1992; **268**: 7346-7349

Warren, H.S., Kinnear, B.F. (1999). Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J Immunol* 1999 Jan. 15; **162**: 735-742

Watanabe, H., Sherris, D., Gilkeson, G.S. (1998). Soluble CD16 in the treatment of murine lupus nephritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998 Jul.; **88(1)**: 91-95

Watanabe, N., Akikusa, B., Park, S.Y., Ohno, H., Fossati, L., Vecchiotti, G., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Verbeek, J.S., Ryffel, B., Iwamoto, I., Izui, S., Saito, T. (1999). Mast cells induce autoantibody-mediated vasculitis syndrome through tumor necrosis factor production upon triggering Fc γ receptors. *Blood* 1999; **94 (11)**: 3855-3863

Williams, T.E., Selvaraj, P., Zhu, C. (2000). Concurrent binding to multiple ligands: Kinetic rates of CD16b for membrane-bound IgG1 and IgG2. *Biophys J* 2000; **79**: 1858-1866

Wines, B.D., Hulett, M.D., Jamieson, G.P., Trist, H.M., Spratt, J.M., Hogarth, P.M. (1999). Identification of residues in the first domain of human Fc α receptor essential for interaction with IgA. *J Immunol* 1999; **162**: 2146-2153

Witte, T., Schmidt, R.E. (1992). Fc γ -Rezeptoren: Struktur, Funktion und klinische Bedeutung. *Immun Infekt* 1992; **20**: 76-80

Zhu, X., Hamann, K.J., Munoz, N.M., Rubio, N., Mayer, D., Herrnreiter, A., Leff, A.R. (1998). Intracellular expression of Fc gamma RIII (CD16) and its mobilization by chemoattractants in human eosinophils. *J Immunol* 1998; **161**: 2574-2579

7. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können und für die Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit;

Herrn Dr. Torsten Witte für die wissenschaftliche Betreuung, die vielen Ideen und die zahlreichen Diskussionen, ohne die diese Arbeit so nie zustande gekommen wäre;

Herrn Prof. Dr. Walter Müller für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit;

allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Immunologie, die auf irgendeine Art und Weise zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben: Andreas, Anja, Anna, Britta, Carsten, Cornelia, Dirk, Engelbert, Esther, Frank, Gabi, Gamal, Gundi, Iska, Jörg, Julia, Karsten, Kerstin, Margot, Marion, Martin, Matthias, Nelli, Olga, Roland, Sabine, Simone, Sonja, Tanja, Torsten und Uli. Ihnen allen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Problemen und natürlich für die anregenden fachlichen und nicht-fachliche Diskussionen und die vielen TGIFs.

Esther und Torsten für die hilfreichen Bemerkungen beim Verfassen dieser Arbeit;

Andreas für die Unterstützung bei der Bewältigung der kleinen und großen Probleme mit unseren Computern

Peter Sondermann und Uwe Jacob für die langen Diskussionsabende im Rahmen der DGfI-Tagungen und die vielen Tips und Tricks per E-Mail;

Frank für ♥, Geduld, Zeit und viel Verständnis, wenn ich nach mißlungenen Experimenten mal wieder schlecht gelaunt war;

und

meinen Eltern für die z.T. finanzielle, vor allem aber ideelle Unterstützung.

8. Lebenslauf

Name: BETTINA DRESCHER
Geburtsdatum: 12. Mai 1970
Geburtsort: Rheine/Westfalen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1977-1981	Grundschule Ehlershausen
1981-1983	Orientierungsstufe Burgdorf
1983-1990	Gymnasium Burgdorf; Abitur Mai 1990

Berufsausbildung:

Oktober 1990-September 1992	Ausbildung zur Medizinisch Technischen Assistentin an der MTA-Schule der Medizinischen Hochschule Hannover; Staatsexamen September 1992
-----------------------------	--

Hochschulausbildung:

Oktober 1992-Oktober 1997	Studium der Biologie an der Universität Hannover
April/Oktober 1994	Diplom-Vorprüfungen
Oktober 1996	mündliche Diplomprüfung
November 1996-September 1997	Anfertigung der Diplomarbeit „Charakterisierung neuer c-Myc-interagierender Proteine“ im Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Dr. B. Lüscher
seit Januar 1998	Anfertigung der Doktorarbeit „Effekt der Glycosylierung von CD16 (FcγRIII) auf das IgG-Bindungsverhalten“ in der Abteilung für Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Herrn Prof. Dr. R.E. Schmidt
	Promotionsprüfung am 13.07.2001

Originalpublikationen:

Werwitzke, S., Drescher, B., Schmidt, R.E., Witte, T. (2000). CD8+ T cell populations in common variable immunodeficiency. *Immunobiology* 2000; 202: 168-171

Boorboor, P., Drescher, B., Hartung, K., Sachse, C., Tsao, B.P., Schneider, P.M., Kalden, J.R., Lakomek, H.J., Peter, H.H., Schmidt, R.E., Witte, T. (2000). Poly(ADP-Ribose) polymerase polymorphisms are not a genetic risk factor for systemic lupus erythematosus in german caucasians. *J Rheum* 2000; 27: 2061

Werwitzke, S., Tiede, A., Drescher, B., Schmidt, R.E., Witte, T. (2001). Activation-induced postthymic differentiation of CD8+ T cells. eingereicht

Drescher, B., Witte, T., Sondermann, P., Schmidt, R.E. (2001). The N-glycosylation of FcγRIII: A mechanism of regulating receptor affinity. in Vorbereitung

Tagungsbeiträge:

Oktober 1998: 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Freiburg (Poster)

Drescher, B., Witte, T., vBodenhausen, A., Schmidt, R.E.:
Generation and purification of soluble CD16-variants

März 1999 15. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Stuttgart (Vortrag)

Drescher, B., Witte, T., Schmidt, R.E.
The functional role of the glycosylation of CD16

Oktober 1999 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Hannover (Poster)

Drescher, B., Witte, T., Schmidt, R.E.
The functional role of the glycosylation of CD16

März 2000 16. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Köln (Vortrag)

Drescher, B., Witte, T., Schmidt, R.E.
The functional role of the glycosylation of CD16

November 2000 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Düsseldorf (Poster)

Drescher, B., Witte, T., Schmidt, R.E.
The functional role of the glycosylation of CD16